ARCHIVES ROUMAINES
DE PATHOLOGIE EXPÉRIMENTALE
ET DE MICROBIOLOGIE

TOME 20 No. 2 JUIN 1961

# CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE L'AVIDITÉ DU SÉRUM ANTITÉTANIQUE

par

P. CONDREA, ELENA POENARU, MIRA ESRIG et J. BITTNER

*(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service des Anaérobies)*

— Manuscrit reçu le 20 septembre 1960 —

En vue d'une juste appréciation de l'efficacité d'un sérum antitoxique, il serait nécessaire, selon certains auteurs, d'effectuer, à part la détermination de la valeur quantitative exprimée en unités toxiques, des recherches sur l'avidité ou sur la valeur qualitative des anticorps du sérum donné.

ROUX (1900) et CRUVEILLIER (1904) ont posé, pour la première fois, le problème de la différence qualitative pour les sérums antidiphtériques. Les insuccès rencontrés parfois dans la sérothérapie antidiphtérique, indépendemment du titre antitoxique, étaient attribués, par ces auteurs, à la présence dans le sérum de substances non-spécifiques.

Selon une série d'auteurs, à commencer par KRAUS (11), qui a introduit le terme d'« avidité », le manque d'efficacité ne serait pas dû aux substances non-spécifiques, ainsi qu'on l'avait supposé au début, mais à la réversibilité du complexe qui se forme entre l'antitoxine et la toxine présente dans l'organisme. MADSEN et SCHMIDT ont démontré cette réversibilité, en libérant la toxine diphtérique du complexe neutre, par addition d'anatoxine, qui possède une affinité plus marquée pour le sérum que la toxine correspondante (16, 17, 21).

Certains sérums se combinent plus rapidement avec la toxine donnant des complexes stables, non-dissociables, d'autres donnent des complexes instables qui, par leur dilution dans les liquides tissulaires, se dissocient facilement en libérant la toxine (GLENNY, POPE, WADDINGTON (7). Basés sur ces faits, GLENNY et BARR ont établi une méthode de détermination de l'avidité des sérums, d'après les résultats des titrages comparatifs « in vivo » et « in vitro », en fixant le rapport entre ces deux valeurs (4, 5, 6).

KJAER (1931) a constaté que dans le cas des sérums antitétaniques, le complexe neutre se dissocie beaucoup plus facilement que dans le cas du sérum antidiphtérique, qui présente une affinité considérablement plus marquée entre la toxine et l'antitoxine correspondante, par rapport au tétanos (12).

Afin de déterminer l'avidité des sérums antitétaniques, GLOTOVA et OSTROVSKAIA (1935) (8) ont classé, à l'aide de la méthode de KJAER, les sérums étudiés en trois groupes: avides, non-avides et semi-avides, selon le degré de stabilité du complexe neutre toxine-antitoxine. Pour le groupe des sérums avides, les animaux inoculés avec ce complexe, additionné d'anatoxine, n'ont présenté — après 4—5 jours d'observation — aucun symptôme de tétanos. Parmi le groupe de sérums non-avides, les auteurs ont classé les sérums qui ont donné des complexes dissociables par addition d'anatoxine; dans ce cas les animaux inoculés ont fait un tétanos mortel. Le complexe du groupe intermédiaire de sérums semi-avides a été incomplètement dissocié, les animaux inoculés présentant à la fin de la période d'observation des signes d'intoxication de I-er et II-e degré.

Attendu que l'avidité représenterait le pouvoir de combinaison, c'est-à-dire, la vitesse avec laquelle un sérum peut neutraliser la toxine « in vivo », il se pourrait que la vitesse de la réaction « in vitro » — appréciée d'après le temps de floculation (Kf) — constitue également un indice d'avidité. LOCKE, MAIN, MILLER, proposent même pour les sérums à fins thérapeutiques de mentionner, en plus de leur contenu en U.A, l'indice d'avidité (qui serait exprimé par le produit entre le titre et le temps de floculation avec une toxine standard) (14).

Effectuant des recherches expérimentales en 1926, MADSEN et SCHMIDT ont observé que pour prévenir l'intoxication diphtérique chez le lapin, il a suffi de 10 U.A. d'un sérum à Kf court = 5 minutes, alors que l'administration d'un sérum à Kf prolongé = 15 heures, a nécessité une dose beaucoup plus élevée — 120 U.A. Reprenant leurs recherches en 1930, MADSEN et SCHMIDT ont constaté qu'effectivement les sérums à réactions rapides donnent les meilleurs résultats thérapeutiques; toutefois les auteurs ont observé qu'il n'existe pas toujours un parallélisme entre la vitesse de floculation d'un sérum et la vitesse de neutralisation „in vivo"; ainsi, on peut prolonger le Kf après avoir maintenu le sérum à 58°—60°, sans que la vitesse de neutralisation en soit retardée (15—17).

Le prolongement du Kf pour le sérum provenant du même cheval, en hyperimmunisation est dû, selon SIEBENMANN, aux troubles pathologiques du sang: anémie prononcée, accompagnée d'ictère et déséquilibre protéique (22).

HALIAPINA, GLENNY et LLEWELLYN-JONES, AUBERTIN et TEISSANDIER affirment de même, qu'il n'existe pas un parallélisme entre la vitesse de floculation et l'action thérapeutique des sérums (9, 6, 1).

## RECHERCHES PERSONNELLES

Nous nous sommes proposé de contribuer au problème de l'avidité du sérum antitétanique, problème important, vu la différence qualitative plus marquée entre les sérums antitétaniques que chez les sérums antidiphtériques, en partie à cause de la complexité de l'antigène utilisé pour l'immunisation. Les filtrats des cultures de bacilles tétaniques, contenant de nombreux antigènes, rendent l'application de la méthode de titrage « in vitro » pour la toxine et l'antitoxine tétaniques, beaucoup plus difficile que pour la diphtérie.

Les discordances en ce qui regarde le degré et le pourcentage entre les deux valeurs « in vivo » et « in vitro », plus marquées pour le sérum antitétanique que pour le sérum antidiphtérique, ont été, au début, attribuées aux résultats non-spécifiques obtenus parfois par la méthode de floculation, considérée par certains

auteurs comme non-appropriée au titrage du sérum antitétanique. Ultérieurement, il a été établi que ces discordances sont dues à la qualité des sérums antitétaniques, dont l'avidité varie beaucoup plus que celle des sérums antidiphtériques.

Dans un travail antérieur (2), ayant comme but l'étude comparative des 2 méthodes: « in vitro » (par la réaction de floculation Ramon) et « in vivo » (par la méthode basée sur les principes d'Ehrlich), nous avons montré qu'en établissant le rapport entre les deux résultats, les sérums antitétaniques peuvent se classer dans les 3 groupes suivants:

1. sérums avides — rapport vivo/vitro $>$ 1
2. sérums non-avides — rapport vivo/vitro $<$ 1
3. sérums semi-avides — rapport vivo/vitro $=$ 1

Les études et les observations du présent travail ont eu comme but:

I. la vérification du rapport vivo/vitro comme indice d'avidité;

II. l'analyse des facteurs qui influencent l'avidité des sérums antitétaniques;

III. la recherche de la valeur thérapeutique des sérums à divers degrés d'avidité.

I. Dans la première partie des recherches, on a tâché de voir dans quelle *mesure le titrage comparatif et l'établissement du rapport vivo/vitro* peuvent servir comme *méthode d'évaluation de l'avidité.* Dans ce but, on a sélectionné un nombre de sérums provenant de chevaux qui se trouvaient à la primo-immunisation après le premier cycle (pendant les années 1954—1956), comme suit:

1. 17 sérums avides — rapport vivo/vitro = 1.17 — 3.27
2. 12 sérums semi-avides — rapport vivo/vitro = 0.90 — 1.12
3. 23 sérums non-avides — rapport vivo/vitro = 0.07 — 0.83

Afin de contrôler la stabilité du complexe toxine-antitoxine sur ces 52 sérums, différents en ce qui concerne leur degré d'avidité, on a tenté la dissociation de ce complexe, par la méthode KJAER. On a fait des mélanges contenant 1/10 U.A. du sérum à étudier, en volume de 1 ml (dilué d'après le titre déterminé « in vivo ») + 1 Lo toxine, en volume de 1 ml (déterminé vis-à-vis de 1/10 U.A. sérum standard Copenhague) + 2 ml sérum physiologique. Après conservation à 37° pendant 45 minutes, on a inoculé 5 souris de chaque mélange. Quatre souris ont reçu 0,4 ml du mélange + des quantités variables d'anatoxine: 0,5 ml de la dilution 1/10, ou de l'anatoxine brute 0,2, 0,4, 0,6 ml. Le mélange avec l'anatoxine a été fait avant l'inoculation, dans la même seringue. La 5-e souris, servant comme témoin, n'a reçu que le mélange neutre sérum-toxine.

L'observation des souris (pendant 4—5 jours) a donné les résultats consignés dans le tableau I, qui ne comprend que quelques exemples des 3 catégories de sérums.

Les sérums avides, ainsi que les semi-avides ont présenté des complexes stables ou légèrement dissociables; toutes les souris ayant reçu le complexe toxine-sérums et anatoxine ont survécu sans présenter le moindre signe de tétanos ou tout au plus des symptômes de tétanos local ($\pm - + \pm$).

Les expériences effectuées sur le 3-e groupe de sérums non-avides, ont montré que dans ce cas le complexe est constamment dissociable. Pour 16 des 23 sérums, toutes les souris ayant reçu le complexe + l'anatoxine sont mortes; 4 sérums ont donné un tétanos généralisé ($+ + \pm - + + +$), alors que les autres 3 sérums n'ont provoqué qu'un tétanos local ($+ - + +$).

*Tableau I*

| | Sérum No. | Titre vivo/vitro UA/ml | Rapport vivo/vitro | 0.5 | Anatoxine | | | Témoin |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 1/10 | 0.2 | 0.4 | 0.6 | |
| I. avides | 404 | 950 750 | 1.26 | + | + | + | + | ± |
| | 409 | 450 270 | 1.66 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 410 | 600 450 | 1.33 | 0 | + | + | ± | 0 |
| II. semi-avides | 395 | 400 415 | 1.00 | 0 | + | + | + | 0 |
| | 405 | 800 800 | 1.00 | + | + | + | + | ± |
| | 406 | 450 450 | 1.00 | + | ± | + | ± | 0 |
| III. non-avides | 347 | 200 945 | 0.21 | — | † | † | † | ± |
| | 351 | 200 1245 | 0.16 | — | † | † | † | + |
| | 377 | 350 580 | 0.60 | † | † | † | † | ± |

*Légende*: ± = léger tétanos local; + = tétanos du degré I
† = tétanos mortel; 0 = absence de tétanos

Les témoins qui avaient reçu le sérum à complexe neutre, dépourvu d'anatoxine, sont restés indemnes ou n'ont présenté qu'un léger tétanos local (± — +).

II. *Les facteurs qui influencent l'avidité du sérum tétanique.* Certains auteurs attribuent à la valeur de l'antigène une importance spéciale, non seulement en ce qui concerne le titre antitoxique du sérum obtenu, mais aussi la qualité de ces anticorps. Les anatoxines à pouvoir de combinaison élevé, donc plus avides pour l'antitoxine, donnent des sérums plus avides.

La méthode d'immunisation est un autre facteur important. RAMON, LEMETAYER, PIROSKY (20) ont remarqué que le sérum antitétanique provenant de chevaux avec une immunité de base acquise par vaccination antérieure avec de l'anatoxine, effectuée une ou plusieures années avant l'hyperimmunisation, diffère du point de vue qualitatif du sérum obtenu des chevaux non-vaccinés. La différence qualitative est indiquée par la discordance vivo/vitro, le titre chez les chevaux sans immunisation de base, déterminé sur souris, étant beaucoup plus réduit que celui obtenu par titrage « in vitro ».

En 1955, l'Institut Dr. I. Cantacuzino a soumis à l'immunisation tétanique 2 groupes de chevaux, maintenus dans des conditions différentes de stabulation; le groupe A dans les fermes de l'Institut (Băneasa et Dîrvari) et le groupe B à l'Institut Pasteur de Bucarest (Giulești). Les résultats des titrages comparatifs vivo/vitro, effectués après le premier cycle sont consignés dans le tableau II.

*Tableau II*

| | Nombre de chevaux | Titre moyen U.A./ml | | Rapport vivo/vitro | | | pourcentage de non-avides |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | vivo | vitro | minimum | maximum | moyen | |
| A. (Inst. Cantacuzino) | 67 | 375 | 803 | 0.08 | 2.06 | 0.52 | 91,0% |
| B. (Inst. Pasteur) | 40 | 940 | 570 | 0.60 | 3.04 | 1.72 | 7,5% |

Les chiffres exposés dans le tableau II montrent une différence marquée en ce qui concerne la qualité des sérums provenant de ces deux groupes de chevaux. Le groupe A présente un pourcentage de beaucoup plus élevé (91%) de sérums non-avides, comparativement au groupe B, dont le pourcentage est seulement de 7,5%.

Poursuivant sur un nombre de chevaux du groupe A l'évolution des titres aux cycles suivants on constate une atténuation de la discordance vivo/vitro, malgré la persistance d'un pourcentage assez élevé de sérums non-avides (tableau III).

*Tableau III*

| Cycle | Titre moyen | | Rapport vivo/vitro | | | Pourcentage de non-avides |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | vivo | vitro | minimum | maximum | moyen | |
| I | 390 | 835 | 0.08 | 2.06 | 0.49 | 96.55% |
| II | 656 | 808 | 0.40 | 1.66 | 0.84 | 58.62% |
| III | 695 | 685 | 0.60 | 2.42 | 1.03 | 50.00% |

On a cru d'abord pouvoir attribuer la différence qualitative des sérums provenant des 2 groupes de chevaux, à des causes non-spécifiques (nourriture, conditions de stabulation) ou au mode d'administration de l'antigène. Au groupe A de l'Institut Cantacuzino la dose a été administrée par inoculation unique, au groupe B (Institut Pasteur) des doses dépassant 100 ml ont été inoculées dans des endroits multiples; cette dernière méthode représente « l'immunisation concentrée » décrite par RAMON, qui soutient que l'effet en serait pareil à celui obtenu après des doses multiples d'antigène.

De l'analyse plus approfondie des faits constatés, ainsi que des observations ultérieures, il ressort que la différence des résultats obtenus pour les deux groupes de chevaux serait due très probablement à la provenance des animaux; en effet, les chevaux du lot B avaient tous été vaccinés au moins une année avant l'hyperimmunisation, alors que les chevaux du groupe A avaient commencé leur premier cycle d'immunisation 30 jours après la vaccination. Cette supposition a été confirmée ultérieurement lorsqu'on a introduit en immunisation antitétanique (tant à Băneasa qu'à Dîrvari) d'autres lots de chevaux qui avaient été vaccinés dans les mêmes conditions que ceux du groupe B, donc au moins une année auparavant. Les résultats obtenus sur ces derniers, comparativement à ceux obtenus sur les chevaux stabulés à Giulești, sont les suivants:

| | titre moyen | | moyenne du rapport vivo/vitro |
|---|---|---|---|
| | vivo | vitro | |
| Băneasa . . . . | 1075 | 414 U.A/ml | 2.40 |
| Dîrvari . . . . | 950 | 433 U.A/ml | 2.19 |
| Giulești . . . . | 940 | 570 U.A/ml | 1.72 |

La méthode employée pour l'immunisation de base est, par conséquent, d'une grande importance, non seulement en ce qui concerne le contenu en anticorps, mais surtout les résultats qualitatifs.

III. *Valeur thérapeutique des sérums antitétaniques présentant divers degrés d'avidité.* Selon les données connues de la littérature, les recherches expérimentales effectuées avec des sérums avides et non-avides ont donné des résultats contradictoires du point de vue efficacité thérapeutique.

Certains auteurs soutiennent que la valeur qualitative des sérums antitoxiques joue un rôle important dans la sérothérapie et que les insuccès seraient dus, en partie, aux sérums non-avides. Selon d'autres investigateurs, la différence entre les deux catégories de sérums serait nulle ou très peu marquée. (GLENNY, L-JONES, 1931, FEJGINA, 1936) (3, 6).

En ce qui concerne le sérum antitétanique, MARGRET LLEWELLYN-SMITH (13) n'a pas trouvé une concordance parfaite entre les divers critériums d'appréciation de la valeur qualitative: 1) le degré de dissociation dans la dilution du complexe toxine-sérum, 2) la courbe d'inclinaison entre les deux doses Lo et Lt et 3) la vitesse de combinaison du sérum avec la toxine; l'auteur recommande d'éviter le terme d'« avidité » employé dans différents sens par d'autres investigateurs.

GLOTOVA et OSTROVSKAIA (8), afin de contrôler l'action thérapeutique des sérums antitétaniques, répartis selon la méthode de KJAER dans les 3 groupes: avides, semi-avides et non-avides, ont appliqué une méthode originale, dénommée par ces auteurs la « méthode directe », en contraste avec celle de KJAER dénommée « méthode indirecte ». Cette dernière, montre le degré de stabilité du complexe toxine-sérum, alors que la méthode directe (GLOTOVA) indiquerait la valeur thérapeutique des sérums étudiés.

La méthode de GLOTOVA et OSTROVSKAIA consiste dans l'inoculation de 100 U.A. sérum antitétanique aux souris ou cobayes qui ont reçu, 20 heures auparavant, 2 DMM de toxine. L'effet curatif a varié selon la qualité du sérum utilisé: les sérums avides et semi-avides ont empêché la mort par tétanos; les sérums non-avides sont restés sans effet.

Par des recherches ultérieures, OSTROVSKAIA (18) a constaté que la valeur thérapeutique dépend, dans une certaine mesure, du titre antitoxique. Les sérums faibles de 150—300 U.A. ml n'ont assuré que 10% de survies, alors que les sérums à titre plus élevé — 300—1200 U.A. — ont permis la survie de 84% des souris qui avaient reçu antérieurement 2 DMM toxine. Ces dernières expériences n'ont pas révélé un parallélisme entre l'avidité et l'effet thérapeutique. La différence entre les deux résultats serait due au fait que les sérums contrôlés ultérieurement étaient des sérums frais, alors que ceux employés dans le travail antérieur étaient des sérums arrivés à maturité (18).

★

Nos recherches ont compris 3 séries d'expériences:

*Première série d'expériences.* On a effectué des recherches d'orientation avec 8 sérums à divers degrés d'avidité, dont le rapport vivo/vitro était de 0,52 et 2,09. Des groupes de souris, inoculées avec 2 DMM toxine, ont reçu à différents intervalles 100 U.A. sérum. Après 4—7 jours d'observation, on a constaté une activité préventive évidente, mais seulement lorsque le sérum était administré à intervalle très court (jusqu'à 2 heures) après la toxine, cas où les animaux ne présentent aucun symptôme de tétanos. Si le sérum est inoculé

tardivement (4—8 heures après la toxine) il n'est plus possible de modifier le tableau clinique, ni d'empêcher la mort des animaux, qui survient, surtout lorsque le sérum a été administré 15—24 heures après la toxine. L'effet a été le même pour tous les 8 sérums expérimentés, indifféremment de leur degré d'activité.

*Seconde série d'expériences.* On a essayé de déterminer sur cobayes et souris, la dose efficiente thérapeutique de sérum, en prolongeant la période d'observation (3 semaines).

Quatorze cobayes, inoculés avec 2 DMM toxine, ont reçu, à intervalle de 20 heures des doses variables de sérum: 100, 200, 500, 1000, 2000, 3000, 5000 U.A. Les animaux ont été contrôlés journellement, durant 3 semaines; 48 heures après l'inoculation de la toxine tous les cobayes ont présenté des symptômes de tétanos (degrés I et II). Le tableau clinique est resté stationnaire ou s'est accentué jusqu'au 7-e jour d'observation, après quoi les symptômes s'atténuaient jusqu'à la guérison complète ou presque complète des animaux, survenue après 3 semaines. Les témoins n'ayant reçu que la toxine, sont morts en 48 heures avec tétanos généralisé. L'expérience a été répétée sur souris. La période d'incubation étant plus courte que chez le cobaye et par conséquent l'évolution de la maladie plus rapide, on n'a inoculé aux souris — afin de vérifier l'effet curatif du sérum — que 1 DMM toxine. Au bout de 19 heures, toutes les souris présentaient un tétanos du degré I. Réparties par groupes de 5, ces dernières ont reçu des doses variables de sérum: 100, 200, 400 et 1250 U.A. Le contrôle quotidien a donné les résultats suivants: témoins — mort dans 3—4 jours; souris qui avaient reçu le sérum — les symptômes se sont accentués finissant parfois par un tétanos généralisé, les contractures s'atténuant petit à petit. La 21-e jour d'observation, toutes les souris étaient guéries, à l'exception de quelques cas présentant tout au plus une légère contracture locale.

Dans les deux expériences, on a utilisé un sérum avec avidité moyenne et rapport vivo/vitro = 1.

L'action thérapeutique a été évidente dans tous les cas, tant chez le cobaye que chez la souris. La dose minimum administrée (100 U.A.) a été tout aussi efficace que la dose maximum (1250 U.A. pour la souris et 5000 U.A. pour le cobaye), les deux conduisant à l'amendement des symptômes et à la guérison complète, après le même intervalle de temps.

*Troisième série d'expériences.* Dans des recherches ultérieures, effectuées toujours sur souris, dans les mêmes conditions de travail, on a testé comparativement la valeur préventive et thérapeutique d'un nombre de 29 sérums, comme suit: 10 sérums avides (rapport vivo/vitro 1,36—2,85), 2 sérums semi-avides (rapport vivo/vitro 1) et 17 sérums non-avides (rapport vivo/vitro 0,08—0,50). La synthèse des résultats a révélé l'effet suivant:

Aucun des 29 sérums, même les plus avides suivant le rapport vivo/vitro, n'a pu prévenir l'apparition du tétanos, qui a causé la mort d'une partie des animaux.

En calculant pour chaque sérum séparément, on constate que les sérums avides donnent le pourcentage le plus élevé de survie: 4 sérums ont marqué les pourcentages maxima, respectivement 81%, 90% et dans deux cas — 100%, le pourcentage minimum étant de 30%; parmi les sérums non-avides seulement deux ont donné des pourcentages élevés de survie (83 et 87%). Onze des 17 sérums

non-avides ont protégé moins de 50% des animaux de l'expérience, le pourcentage minimum étant dans un seul cas 0.

Du groupe des sérums semi-avides, on n'a utilisé que deux: le premier a donné un pourcentage de 86,66 et 100% survies, le second a protégé dans la première expérience 100% des animaux et dans la deuxième seulement 25%.

Le calcul total a donné, pour les deux groupes de sérums — avides et non-avides — les pourcentages moyens de survie suivants:

61,40% survies (70 de 114 souris) pour les sérums avec rapport vivo/vitro $>1$

36,10% survies (69 de 188 souris) pour les sérums avec rapport vivo/vitro $<1$

En résumé, il résulte des expériences citées que l'action du sérum antitétanique est plutôt préventive. Même les sérums très avides, considérés comme tels selon le rapport vivo/vitro, sont pour la plupart inefficaces, lorsqu'ils sont administrés tardivement, c'est-à-dire après l'installation du tableau clinique. L'institution précoce de la sérothérapie, dès l'apparition des premiers symptômes, n'influence pas l'évolution de la maladie, indifféremment de la qualité du sérum, avec la seule différence que le pourcentage de mortalité est un peu plus élevé dans le cas des sérums non-avides.

Le pourcentage de survie, considéré pour chaque sérum à part, n'a pas été proportionnel à la valeur du rapport vivo/vitro.

## CONCLUSIONS

L'étude comparative des deux critériums d'appréciation de l'avidité du sérum antitétanique: 1. rapport vivo/vitro et 2. le degré de stabilité du complexe toxine-antitoxine a révélé un parallélisme entre les résultats obtenus par ces deux méthodes. Les sérums dont le titre « in vivo » est inférieur au titre « in vitro » représentent les sérums non-avides, qui donnent des complexes facilement dissociables.

La méthode d'immunisation, c'est-à-dire l'application dans de bonnes conditions de l'immunisation de base, exerce une influence favorable sur l'avidité du sérum antitétanique.

Nos expériences ne montrent pas une différence marquée en ce qui concerne la valeur thérapeutique des sérums antitétaniques à degrés d'avidité différents.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Aubertin E. et Teissandier J. — C. R. Soc. Biol., 1932, **109**, 387.
2. Condrea P., Poenaru E., Esrig M. et Bittner J. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologic., 1958, **17**, 15.
3. Fejgina S. — Rev. d'Immunol., 1936, **2**, 494.
4. Glenny A. T. et Barr Mollie. — Journ. of Path. a. Bact., 1932, **35**, 91.
5. Glenny A. T. et Barr Mollie. — Journ. of Path. a. Bact., 1932, **35**, 142.
6. Glenny A. T. et Llewelyn-Jones Mona. — Journ. of Path. a. Bact., 1931, **34**, 110.
7. Glenny A. T., Pope C. G. et Waddington Hilda. — Journ. of Path. a. Bact., 1925, **28**, 279.
8. Glotova et Ostrovskaia. — Zeitsch. f. Immunitätsforsch. 1935, **86**, 146.
9. Haliapina K. — Zeitschr. f. Immunitätsforsch., 1928, **56**, 7.
10. Jerne N. K. — Acta Path. Microb. Scand. suppl., 1951, 87.
11. Kraus R. et Baecher S. — Zentralbl. f. Bakt., 1913, Ref. 57, suppl. 106.
12. Kjaer T. — C. R. Soc. Biol., 1931, **107**, 333.
13. Llewellyn-Smith Margaret. — Bull. Org. Hyg., 1938, **7**, 738.
14. Locke A., Maine. R. et Miller. F.A. — Journ. of Inf. Dis., 1927, **41**, 32.

15. Madsen Th. et Schmidt S. — Ann. Inst. Pasteur, 1926, **40**, 300.
16. Madsen Th. et Schmidt S. — C. R. Soc. Biol., 1929, **102**, 1091.
17. Madsen Th. et Schmidt S. — Zeitschr. f. Immunitätsforsch., 1930, **65**, 357.
18. Ostrovskaia O. A. — J. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1939, No. 1, 112.
19. Ramon G. — C. R. Soc. Biol., 1930, **104**, 31.
20. Ramon G., Lemetayer E. et Pirosky I. — C. R. Soc. Biol., 1937, **125**, 967.
21. Schmidt S. — C. R. Soc. Biol., 1929, **102**, 1095.
22. Siebenmann Ch. — J. Immunol., 1932, **23**, 285.

## К ИЗУЧЕНИЮ АВИДИТЕТА ПРОТИВОСТОЛБНЯЧНОЙ СЫВОРОТКИ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Вследствие сравнительного изучения двух критериев оценки авидитета противостолбнячной сыворотки, а именно: 1) отношение между титром « *in vivo* » и « *in vitro* » и 2) стойкость комплекса токсин-антитоксин, — установлено что между результатами, полученными при помощи данных двух способов, существует параллелизм, причем сыворотки с титром « *in vivo* » ниже чем « *in vitro* », являются неавидными сыворотками, дающими легко диссоциируемые комплексы.

Метод иммунизации животных-продуцентов, и в особенности проведение в надлежащих условиях грундиммунизации, влияет положительно на авидитет противостолбнячной сыворотки.

Проведенные опыты не дали возможность установить наличие выраженной разницы между терапевтическими свойствами противостолбнячных сывороток с разными степенями авидитета.

## BEITRÄGE ZUM STUDIUM DER AVIDITÄT DES TETANUS ANTISERUMS

ZUSAMMENFASSUNG

Eine vergleichende Untersuchung der beiden Kriterien zur Beurteilung der Avidität von Tetanusantisera, d.h. 1. des „*in vivo/in vitro*“ Verhältnisses und 2 der Stabilität des Toxin — Antitoxinkomplexes ergab, dass die durch diese beiden Methoden erhaltenen Ergebnisse einander parallel laufen, wobei die Sera, deren Titer „*in vivo*“ niedriger ist als „*in vitro*“, eine geringe Avidität aufweisen und leicht dissoziable Komplexe bilden.

Das Immunisierungsverfahren, und zwar die Durchführung der Grundimmunisierung unter entsprechenden Bedingungen, beeinflusst die Avidität der Tetanus Antisera in günstigem Sinne.

Aus der Erfahrung der Verfasser geht nicht hervor, dass zwischen der therapeutischen Wirksamkeit von Tetanus Antisera verschiedener Avidität nennenswerte Unterschiede bestünden.

## CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF AVIDITY IN TETANUS ANTISERA

SUMMARY

A comparative investigation of the two criteria of avidity in tetanus antisera i.e. of 1) the “*in vivo/in vitro*” ratio and 2) the degree of stability of the toxin-antitoxin complexes, revealed the existence of a parallelism between the results obtained by means of the two methods. Sera whose titre is lower “*in vivo*” than “*in vitro*” display poor avidity and form readily dissociable complexes.

The method of immunization, namely the performance of basic immunization in adequate conditions, exerts a favourable influence on the avidity of tetanus antisera.

According to the experience of the authors, there is no evidence of a marked difference as regards the therapeutic efficiency of tetanus antisera displaying different degrees of avidity.

# ÉTUDE EXPÉRIMENTALE SUR LA VACCINATION INTENSIVE PAR VOIE ORALE AVEC LE VACCIN B.C.G.

par

Virginia Botez
Maria Paraschivesco
*(Service du Vaccin BCG)*

I. Angelesco
*(Laboratoire Central pour le Contrôle d'Etat des Sérums et Vaccins)*

C. Bonciu,
Monica Petrovici
*(Service d'Anatomie Pathologique)*

— Manuscrit reçu le 2 septembre 1960 —

La vaccination au BCG par voie buccale, pratiquée selon la méthode originale de Calmette (3 doses à 10 mg BCG per os administrées les premiers 10 jours de vie), détermine un pourcentage réduit de virages tuberculiniques. Ce fait a constitué — à mesure que le critérium de l'allergie post-vaccinale était considéré comme essentiel dans l'appréciation de la valeur de l'immunité acquise — la raison majeure pour laquelle, peu à peu, on a accordé la préférence aux techniques parentérales de vaccination.

Cependant, depuis quelques années la vaccination au BCG par voie buccale, « ingénieusement rajeunie » (1) par l'école brésilienne sous la direction d'Arlindo de Assis, retient de plus en plus l'attention des spécialistes.

Dans le but de renforcer les mécanismes immunitaires et d'obtenir une plus grande proportion d'allergisation à la tuberculine, les auteurs sud-américains ont administré, par voie buccale, de fortes doses répétées de vaccin BCG (souche Moreau), sans discrimination, c'est-à-dire à une population non-testée au préalable du point de vue tuberculinique. Après l'essai de plusieurs formules intermédiaires ils sont arrivés à la vaccination « concomitante », avec 600 mg BCG administrés en 6 doses pendant les premiers 6 mois de vie.

Il est certain que cette méthode de vaccination, fondée sur un schéma d'immunisation intensive ayant pour but de maintenir l'organisme sous un stimulus antigénique neurotrophique prolongé, a une autre base neurofonctionnelle que la méthode initiale de Calmette. Ce fait est aussi valable pour la vaccination avec une forte dose unique, de 200 mg BCG — formule qui n'est efficiente que pour les nouveau-nés et les nourrissons de moins de 6 mois — par laquelle l'imprégnation bacillaire massive sollicite à l'organisme une réponse immunitaire d'une toute autre ampleur.

La perméabilité digestive des nouveau-nés vis-à-vis des mycobactéries, soutenue par Calmette, a été prouvée par voie expérimentale et amplement démontrée lors du drame de Lübeck.

Chez l'enfant et chez l'adulte, la perméabilité aux bacilles BCG ou à leurs fractions antigéniques, intervenant dans la résistance spécifique, est prouvée par les modifications de l'allergie tuberculinique consécutive à l'ingestion du

vaccin, de même que par la positivation de la réaction de MITSUDA chez les individus indemnes de lèpre, vaccinés par voie buccale au BCG (2). D'autre part, GERNEZ-RIEUX et coll. (3), ainsi que DRABKINA et coll. (4) ont obtenu la preuve bactériologique du passage du BCG à travers la muqueuse digestive des cobayes adultes, allergiques et non-allergiques.

Les premiers résultats satisfaisants obtenus par la vaccination perorale intensive ont fait penser qu'ils étaient dus, non au nouveau schéma d'immunisation, mais aux propriétés particulières de la souche BCG MOREAU, employée par de ASSIS pour la préparation du vaccin. La confirmation des travaux sud-américains à l'aide des vaccins préparés avec d'autres souches de BCG, et en particulier avec la souche française, a exclu cette hypothèse.

Il faut souligner que l'application de la vaccination perorale intensive chez l'homme n'a eu aucune base expérimentale préalable et que les quelques résultats des recherches récentes sur animal ont conduit à des divergences d'opinions qui doivent être éclaircies.

Étant donné l'application sur échelle de plus en plus large de cette méthode, et surtout son emploi limité en Roumanie, nous nous sommes proposé de créer un modèle expérimental permettant la détermination du degré de résistance conférée par la vaccination perorale intensive par rapport aux méthodes de vaccination parentérale.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

La vaccination expérimentale perorale intensive a été réalisée sur 210 cobayes, dont 180 vaccinés et tuberculisés et 30 témoins, infectés et non-vaccinés.

Les cobayes, de 300 à 350 g, IDRT-négatifs, constitués en 7 lots égaux, ont été vaccinés par voie perorale ou parentérale, selon les suivants schémas d'immunisation:

— lot 1: vaccination perorale par 4 doses mensuelles à 100 mg BCG;

— lot 2: vaccination perorale par 16 doses hebdomadaires à 25 mg BCG;

— lot 3: vaccination perorale par 3 doses à 33 mg BCG, la première semaine de chaque mois, pendant 4 mois;

— lot 4: vaccination intradermique par 1 mg BCG;

— lot 5: vaccination percutanée, par 32 piqûres, avec du vaccin BCG frais, contenant 40 mg germes/ml.

Les animaux des deux derniers lots ont été revaccinés selon le même schéma 100 jours après la première immunisation. A cette occasion on a effectué l'inoculation intradermique des animaux du 6-e lot avec 1 mg BCG.

La vaccination perorale a été effectuée à l'aide d'une aiguille recourbée, pourvue au bout distal d'une olive, permettant l'introduction sans difficulté de la suspension vaccinale directement dans l'estomac de l'animal à jeun.

On a systématiquement noté la courbe pondérale des animaux, en poursuivant en outre chez les vaccinés par voie parentérale l'apparition, l'évolution et la durée de la lésion locale.

L'allergie tuberculinique a été enregistrée après 60, 90 et 230 jours à partir de la vaccination, en employant 0,1 ml tuberculine brute, diluée à 1/10.

L'infection virulente a été faite par voie souscutanée avec $10^{-4}$ mg bacilles tuberculeux — souche $H_{37}Rv$ culture de 13 jours sur pommes de terre

glycérinées — 230 jours après la première dose vaccinante. Pour les cobayes du lot 6, la période écoulée entre la première vaccination intradermique et l'inoculation d'épreuve n'a été que de 130 jours. Les conditions d'inoculation des 30 cobayes témoins ont été identiques.

Les animaux ont été tenus sous observation pendant 105 jours, respectivement jusqu'au moment où 53% des cobayes témoins ont succombé avec des lésions tbc généralisées. Pendant la période d'observation, on a poursuivi la courbe pondérale, l'évolution des lésions de surinfection virulente et les modifications des ganglions satellites.

Tous les cobayes qui ont survécu à cette période expérimentale ont été sacrifiés 105—107 jours après l'infection d'épreuve. L'appréciation macroscopique et microscopique de l'extension et de l'intensité de l'infection tbc a été effectuée selon la méthode et les critériums décrits dans un travail antérieur (5). Le degré de protection conféré par les deux méthodes (perorale et parentérale) a été calculé et comparé en fonction du pourcentage de réduction de la masse des lésions tbc des animaux vaccinés par rapport aux témoins. Étant donné la similitude de comportement des animaux des lots 4 et 6, vaccinés par voie intradermique, à 100 jours d'intervalle, les données fournies par le dernier lot sont inclues dans les résultats du lot 4.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'étude comparative de l'efficacité des méthodes utilisant la vaccination au BCG orale et parentérale, a conduit aux résultats suivants:

1. *La vaccination intensive des cobayes adultes* par voie buccale, avec 400 mg de vaccin BCG fractionnés en 4—16 doses, présente une tolérance et une innocuité parfaites. La courbe pondérale des animaux a montré une ascension correspondant à l'augmentation du poids physiologique pendant la période d'observation (230 jours), la moyenne individuelle étant de 392 g. Chez 9% des cobayes du lot 2 on a constaté des adénopathies cervicales passagères; le fait que ces lésions n'ont été rencontrées que chez les animaux immunisés d'après le schéma prévoyant la plus grande fréquence des doses, nous détermine à les attribuer aux traumatismes répétés produits par l'aiguille-sonde, pendant l'administration du vaccin.

2. *La sensibilité tuberculinique*, dépistée après 60 jours du début de l'immunisation, a été présente: chez 88,9% des cobayes vaccinés par voie orale (après ingestion — en moyenne — de 200 mg BCG), chez 97,4% de ceux inoculés par voie intradermique et chez 90,8% des animaux vaccinés par voie percutanée. L'allergie cutanée consécutive à la vaccination buccale a été moins intense que celle induite par les méthodes parentérales de vaccination, la méthode intradermique donnant les plus nombreux et intenses virages tuberculiniques.

Il est intéressant de remarquer que le pourcentage et le degré d'allergisation des animaux vaccinés par voie orale a varié selon le schéma d'immunisation: à la suite d'une même quantité totale de vaccin, la sensibilité tuberculinique a été nettement supérieure chez les cobayes qui ont reçu par 3 doses de 33 mg BCG la première semaine de chaque mois, l'allergie la plus réduite s'enregistrant chez les animaux inoculés tous les 7 jours avec 25 mg BCG (tableau I).

Nous attribuons une importance particulière à la constatation que l'allergie déterminée par une ou plusieurs doses orales de BCG, en plus du fait qu'elle

*Tableau I*

| Intensité de la réaction allergique | Lot 1 | Lot 2 | Lot 3 | Lot 4 | Lot 5 |
|---|---|---|---|---|---|
| négative | 10.4% | 16.2% | 6.8% | 2.6% | 9.2% |
| 0— 5 mm | 13.8% | 11.8% | 10.5% | 4.2% | 12.4% |
| 5—10 mm | 38.8% | 42.0% | 26.5% | 10.8% | 29.4% |
| 10—15 mm | 25.4% | 21.0% | 36.0% | 30.0% | 27.5% |
| 15—20 mm | 11.6% | 9.0% | 18.5% | 35.4% | 21.5% |
| au-dessus 20 mm | 0 | 0 | 1.7% | 17.0% | 0 |

est durable, s'intensifie dans la majorité des cas (68,8%), à mesure qu'on répète les prises de vaccin.

Nous n'avons jamais observé, indifféremment de la dose et du rythme d'absorption du vaccin, ni une anergie totale, attribuée par Le Chuiton (6) à une hyperimmunité qui masquerait les manifestations allergiques, ni une désensibilisation tuberculinique comparable à celle obtenue expérimentalement sur cobaye par Galzerano (7) ou Kagramanov (8). En même temps, le contrôle allergométrique des cobayes, repété à 230 jours après la vaccination, a montré une identité évidente entre la persistance et la durée de l'allergie post-vaccinale obtenue par la méthode orale et celle déterminée par les techniques parentérales. Nous inclinons à croire que les quelques cas (12,8%) qui ont présenté une diminution du degré initial d'allergisation, peuvent être attribués à d'autres causes plutôt qu'à la désensibilisation par vaccinations répétées.

3. Après l'inoculation d'épreuve, *le nodule de surinfection virulente* a abcédé et s'est ulcéré chez 11% des cobayes vaccinés par voie parentérale et chez 35% des animaux témoins; ces réactions ont toujours été accompagnées d'importantes lésions tuberculeuses. L'absence de réaction à la réinfection, respectivement l'absence de l'ulcère et de l'abcès chez les cobayes vaccinés par voie buccale est significative; cette constatation — tenant compte du degré de résistance spécifique des cobayes — confirme l'opinion de Frappier (9), selon laquelle «le silence tissulaire» peut être un indice de valeur en ce qui concerne l'immunité post-vaccinale.

4. Pendant la période d'observation (105 jours après l'infection virulente) *la mortalité* a été de: 8% pour les cobayes vaccinés par voie orale, 25% pour ceux inoculés par voie parentérale et 53% pour les animaux témoins.

5. *L'examen anatomo-pathologique* des animaux sacrifiés 105 jours après l'infection d'épreuve, ainsi que des animaux morts avant cette date, a montré

que 12% des cobayes du lot 3 et 6,5% du lot 4 ne présentaient pas de tuberculose. Les lésions tbc chez environ 32% des animaux qui ont reçu le vaccin par voie orale, ont été limitées exclusivement au système ganglionnaire — régional ou général — tandis que l'affection exclusivement ganglionnaire n'a été observée que chez 15% des cobayes vaccinés par voie parentérale et jamais chez les témoins.

La fréquence des lésions tbc chez les cobayes vaccinés par voie orale a été de: 68,3% dans la rate, 20% dans le foie et 8,6% dans le poumon; de ce point de vue les données fournies par les animaux immunisés par voie parentérale sont suggestives, la fréquence des lésions tbc se repartisant: 86,5% dans la rate, 58,5% dans le foie et 8,5% dans le poumon. Il faut également souligner que des deux méthodes de vaccination parentérale, la méthode percutanée — par piqûres multiples — a conféré la prémunisation la plus faible.

6. *L'examen histopathologique* (l'extension et l'intensité de l'infection tbc étant exprimées en chiffres (10)), a permis — cette fois aussi — à marquer et signaler des différences évidentes, en ce qui concerne le degré de résistance conféré expérimentalement par les différentes techniques de vaccination; en effet, par cette méthode, l'indice moyen de tuberculisation (= 4.3) présenté par les cobayes vaccinés par voie orale a été sensiblement plus réduit que celui des animaux immunisés par voie intradermique (= 5.3) ou percutanée (= 6.8). Il en résulte aussi un décalage important entre les indices de protection — exprimés par le taux de réduction de la masse des lésions tbc — indices que les méthodes mentionnées assurent chez les animaux vaccinés. Étant donné que l'indice moyen de protection conféré par la vaccination perorale a été de 62% et celui consécutif à l'immunisation parentérale de seulement 47%, il ressort clairement que ce décalage est en faveur de la première méthode. Dans le même sens plaide aussi la confrontation de l'aspect et du type des modifications pathologiques observées au niveau des organes: les lésions tbc présentées par les cobayes vaccinés par voie parentérale étaient plus disséminées, plus étendues et plus avancées que les lésions des animaux immunisés par voie buccale et qui ont bénéficié en même temps des plus nombreuses réactions fibroblastiques (tableau II).

La justesse de nos observations expérimentales est confirmée par les succès dans la vaccination humaine — en particulier celle des nourrissons — obtenus par Bernard (11), Gernez-Rieux (12), Fourestier (13) et par les auteurs sud-américains.

7. L'étude comparative des 3 lots de cobayes vaccinés par voie buccale présente un intérêt particulier. En effet, de *l'analyse des indices de tuberculisation et de protection* présentés par ces animaux, il ressort d'une manière évidente que la résistance la plus prononcée à l'infection tbc a été obtenue par l'administration de 3 doses de 33 mg BCG chacune, à 2 jours d'intervalle, la première semaine de chaque mois, pendant 4 mois (lot 3), tandis que l'ingestion hebdomadaire de 25 mg BCG, par 16 fois, a déterminé un degré d'immunité nettement inférieur (lot 2).

Vu que la quantité totale de vaccin a été la même pour tous les lots, il résulte que les différences observées sont dues aux modifications du schéma d'immunisation; cette constatation montre clairement — dans le cas des inoculations multiples d'antigène — l'importance et l'intervention de la « loi des intervalles » dans la réponse immunitaire de l'organisme. Nos recherches ont prouvé que le schéma respectant l'intervalle d'un mois entre les administrations du vaccin,

représente un rythme acceptable d'immunisation, l'effet immunitaire le meilleur étant obtenu en fractionnant la dose mensuelle de vaccin en 3 quantités égales, ingérées à deux jours d'intervalle. Les résultats moins satisfaisants obtenus à la suite de l'administration hebdomadaire du vaccin pourraient s'expliquer par une perturbation des mécanismes de défense de l'organisme, consécutive à l'intervention intempestive du stimulus antigénique, qui — finalement — mènerait à une « fatigue immunitaire » (14) ou au phénomène de « paralysie immunitaire » décrit par FELTON et OTTINGER (15).

*Tableau II*

| Lots de cobayes | Fréquence tbc. % | Indices de tuberculisation | | Indices de protection % | Lésions tbc. ganglionnaires | | | | | | Lésions tbc. | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | moyens | extrêmes | | Fréquence des lésions % | Nombre de gangl. pris | Indices de tuberculisation moyens | Indices de tuberculisation extrêmes | Lés. nécrotiques % | Réac. fibroblast. % | Fréquence des lésions % | Indices de tuberculisation moyens | Indices de tuberculisation extrêmes |
| lot 1 | 100 | 4.6 | 2.0—6.1 | 60 | 100 | 1—3 | 2.6 | 2.0—3.3 | 33 | 100 | 67 | 1.8 | 0—2.8 |
| lot 2 | 100 | 4.8 | 1.7—8.9 | 58 | 100 | 2—3 | 2.9 | 1.7—3.6 | 50 | 100 | 75 | 1.5 | 0—3.3 |
| lot 3 | 88 | 3.5 | 0—5.6 | 69 | 88 | 1—3 | 2.5 | 0—3.4 | 50 | 100 | 63 | 0.9 | 0—2.2 |
| lot 4 | 93.5 | 5.3 | 0—8.5 | 54 | 93.5 | 1—3 | 2.6 | 0—4.3 | 62 | 92 | 73 | 1.8 | 0—3.3 |
| lot 5 | 100 | 6.8 | 5.6—8.5 | 40 | 100 | 2—4 | 3.4 | 2.8—3.8 | 80 | 80 | 100 | 2.6 | 2.0—3.5 |
| témoins | 100 | 11.4 | 7.8—16.5 | — | 100 | 3—6 | 4.0 | 2.8—5.0 | 82 | 76 | 100 | 3.7 | 2.1—4.7 |

8. Il faut mentionner le fait particulièrement suggestif que *les variations de la résistance spécifique* conférée par les 3 méthodes d'ingestion du vaccin ont été associées aux variations correspondantes du pourcentage et de l'intensité des virages tuberculiniques (tableau I). Le fait que les plus nombreux et les plus intenses tests tuberculiniques ont été enregistrés chez les animaux du lot 3, qui ont bénéficié en même temps du plus haut degré de protection vis-à-vis de l'infection virulente, nous permet de soutenir le point de vue déjà exprimé (5), c'est-à-dire, que les *réactions allergiques ont la signification d'une réaction d'immunité.*

En faveur de cette opinion plaide également l'observation que les animaux (68,8%), dont la sensibilité tuberculinique initiale a sensiblement augmenté à la suite de la répétition des prises de vaccin, extériorisant ainsi — de la part de l'organisme — une réponse active à l'antigène ingéré, ont présenté en même temps la plus haute résistance spécifique, exprimée par l'indice moyen de tuber-

culisation le plus réduit (3,2) rencontré chez les animaux vaccinés. D'autre part, contrairement à l'attente, les lésions tbc les plus avancées ont été trouvées chez les cobayes (6,8%) chez qui la positivité tuberculinique a subi une diminution appréciable entre le premier et le troisième test faits à 60 et 230 jours après la vaccination, l'indice moyen de tuberculisation du groupe respectif d'animaux étant 5,6. Ces observations infirment la notion d'« immunité anérgique », considérée par KRAUS et DVORAK (16) comme le modèle idéal de la résistance post-vaccinale, mettant également en discussion la valeur et la signification immunitaire de « l'allergie infratuberculinique ».

| spleniques | | Lésions tbc. hépatiques | | | | | Lésions tbc. pulmonaires | | | | Lésions tbc. renales | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Lésions nécrotiques % | Réac. fibroblast. % | Fréquence des lésions % | Indices de tuberculisation moyens | Indices de tuberculisation extrêmes | Lésions nécrotiques % | Réac. fibroblast. % | Fréquence des lésions % | Indices de tuberculisation moyens | Indices de tuberculisation extrêmes | Lésions nécrotiques % | Fréquence des lésions % | Indices de tuberculisation moyens | Indices de tuberculisation extrêmes | Réac. fibroblast. % |
| 50 | 50 | 33 | 0.3 | 0—1 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 17 | 100 | 13 | 0.13 | 0—1 | 0 | 100 | 13 | 0.13 | 0—1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 40 | 13 | 0.06 | 0—0.5 | 0 | 100 | 13 | 0.06 | 0—0,5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 64 | 36 | 47 | 0.7 | 0—2 | 0 | 87 | 7 | 0.07 | 0—1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 30 | 30 | 70 | 0.8 | 0—2 | 0 | 100 | 10 | 0.1 | 0—1 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 77 | 24 | 94 | 2.2 | 0—4 | 31 | 81 | 53 | 0.9 | 0—2.5 | 22 | 18 | 0.2 | 0—1 | 100 |

## CONCLUSIONS

1. La vaccination perorale intensive des cobayes adultes, avec 400 mg vaccin BCG, détermine une résistance anti-tuberculeuse nettement supérieure à la vaccination par voie parentérale (intradermique ou percutanée). En présence de la même quantité globale de vaccin, le degré de résistance paraît dépendre du nombre des doses et du rythme de leur administration.

2. Dans la majorité des cas, les doses répétées de vaccin déterminent l'augmentation du taux initial et de l'intensité des virages tuberculiniques; la résistance spécifique des animaux vaccinés varie dans le même sens que ces phénomènes. On n'a réussi à mettre en évidence aucune dissociation entre le degré de la sensibilité tuberculinique et celui de la protection post-vaccinale.

3. Les résultats obtenus expérimentalement, extrapolés — avec toutes les réserves nécessaires — à la vaccination humaine, nous permettent de considérer que l'immunisation par voie buccale avec de grandes doses de vaccin, administrées

selon un schéma qui puisse assurer la répétition judicieuse des incitations antigéniques, constitue une méthode de vaccination qui représente pour le moins autant d'intérêt que les méthodes parentérales, à cause de son efficacité et la facilité d'application.

BIBLIOGRAPHIE

1. Weill-Hallé B. — Bull. Union Intern. contre la tuberculose, 1958, **28**, 94.
2. Floch H. — Bull. Soc. Path. Exot., 1954, **47**, 207.
3. Gernez-Rieux C., Breton A., Tacquet A., Gérard A., Fabre M. et Piat G. — Rev. Tuberc., 1954, **18**, 677.
4. Drabkina R. S. et Sukhodolskaia A. E. — J. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunol., 1957, No. 10, 78.
5. Botez V., Paraschivesco M., Angelesco I., Nafta I., Bonciu C. et Petrovici M. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiol. 1960, **19**, 551.
6. Le Chuiton F., Chambry J. L. G. et Daoulas R. J. — Bull. Acad. Nat. Méd., 1959, **143**, 266.
7. Galzerano G. — Arch. Tisiol., 1954, **9**, 16.
8. Kagramanov A. I. et Makarevitch N. M. — Prob. Tuberk. (en russe) 1958, **36**, 80.
9. Frappier A., Martineau B. et Dobija M. — Ann. Inst. Pasteur, 1954, **87**, 131.
10. Bonciu C., Eustatziou G., Ioan C. L., Berceano S. et Zuzovschi G. — Contribution à l'étude de la chimiothérapie tbc, Acad. R.P.R., 1949, **1**, 150.
11. Bernard E. — Bull. Acad. Nat. Méd., 1959, **143**, 312.
12. Gernez-Rieux C., Gervois M. et Lebeurre R. — Maroc. Méd., 1959, **38**, 581.
13. Fourestier M., Marsault J., Blacque-Belair A. et Robert R. — Sem. Hôp. Paris, 1960, **36**, 84.
14. Timakov V. D. et Ananieva E. P. — J. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunol., 1939, **9**, 87.
15. Felton L. et Ottinger B. — J. Bact., 1942, **43**, 94.
16. Kraus R. et Dvorak M. — Presse Méd., 1954, **81**, 1680.

## ИНТЕНСИВНАЯ ПЕРОРАЛЬНАЯ ВАКЦИНАЦИЯ ВАКЦИНОЙ Б.Ц.Ж. В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Экспериментальные исследования в области интенсивной пероральной вакцинации вакциной Б.Ц.Ж. привели к следующим выводам:

1. Интенсивная пероральная вакцинация взрослых морских свинок при помощи 400 мг Б.Ц.Ж. обуславливает устойчивость против туберкулеза, четко превосходящую устойчивость, наступающую вследствии парэнтерального (внутрикожного или накожного) введения; при одинаковом общем количестве вакцины степень устойчивости зависит повидимому от кратности введений и от интервалов между ними.

2. В большей части случаев повторение дозы вакцины обуславливает повышение исходного процента перехода туберкулиновых реакций в положительные, также как и повышение их интенсивности; специфическая устойчивость привитых животных меняется в том же направлении, как и данные явления. Не установлено, какое-либо расхождение между степенью чувствительности к туберкулину и степенью послепрививочной защиты.

3. Оценивая результаты, полученные в экспериментальных условиях — разумеется со всеми необходимыми оговорками — применительно к вакцинации человека, авторы считают, что пероральная иммунизация большими дозами вакцины, вводимыми соответственно такой схеме, которая обеспечивала бы правильную последовательность антигенных раздражений, заслуживает, благодаря ее эффективности и легкости применения, по крайней мере такой же интерес, как и парэнтеральные методы.

## EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE INTENSIVE PERORALE B. C. G. — SCHUTZIMPFUNG

ZUSAMMENFASSUNG

Experimentelle Untersuchungen über die intensive perorale B.C.G. — Schutzimpfung führten zu nachstehenden Schlussfolgerungen:

1. Die intensive perorale Schutzimpfung erwachsener Meerschweinchen mit 400 mg B.C.G. rief eine Widerstandsfähigkeit gegen Tuberkulose hervor, welche die durch parenterale (intra-oder perkutane) Verabreichung erzielte klar übertrifft. Bei ein und derselben Gesamtmenge des Schutzimpfstoffes scheint das Ausmass der Widerstandsfähigkeit von der Anzahl der Dosen und von den zeitlichen Abständen ihrer Verabreichung abzuhängen.

2. In der Mehrzahl der Fälle führt die Wiederholung der Schutzimpfstoffdosen zu einer Erhöhung des ursprünglichen Prozentsatzes und der Intensität der Tuberkulinreaktionen. Die Schwankungen der spezifischen Widerstandsfähigkeit der geimpften Tiere sind diesen Erscheinungen gleichsinnig. Es konnte keinerlei Dissoziation zwischen dem Ausmass der Tuberkulinempfindlichkeit und der postvakzinalen Schutzwirkung nachgewiesen werden.

3. Eine Übertragung dieser experimentellen Ergebnisse auf die Schutzimpfung beim Menschen gestattet — unter allen erforderlichen Vorbehalten — die Annahme, dass die perorale Immunisierung mit grossen Impfstoffdosen nach einem Schema, das eine zweckentsprechende Wiederholung der Antigenreize gewährleistet, eine Schutzimpfungsmethode darstellt, die auf Grund ihrer Wirksamkeit und leichten Anwendbarkeit zum mindesten das gleiche Interesse verdient wie die parenteralen Verfahren.

## AN EXPERIMENTAL STUDY OF INTENSIVE PERORAL BCG. IMMUNISATION

SUMMARY

An experimental investigation concerning intensive peroral BCG. immunization has led to the following conclusions:

1. Intensive peroral immunization of adult guinea-pigs with 400 mg. BCG. results in a degree of resistance to tuberculosis which is definitely superior to that induced by the parenteral (intradermal or percutaneous) introduction of the vaccine. For the same total amount of vaccine, the degree of resistance appears to depend on the number of doses and the rate of their administration.

2. In most cases, repeated doses result in increased percentage rates and intensities of the tuberculin reactions (as compared to the initial ones). Specific resistance in the immunized animals varies in the same direction as these phenomena. No dissociation could be demonstrated between the degree of tuberculin sensitivity and that of protection consequent on immunization.

3. By transferring these experimental results (with all due qualifications) to immunization in humans, we may assume that peroral immunization with large vaccine doses administered according to a schedule providing judicious repetition of the antigenic stimuli, affords an efficient and readily performed method of vaccination, and hence deserves at least the same attention as the parenteral methods.

# LE VACCIN ASSOCIÉ DIPHTÉRO-TÉTANO-PERTUSSIS

*NOTE I*

par

Gh. Calalb
Alice Saragea
Ecaterina Stănică
Paula Maximesco
H. Kranzdorf
Cecilia Stoian
*(Service de la Diphtérie)*

Elena Poenaru
Mira Esrig
*(Service du Tétanos)*

N. Pozsgi
Viorica Andreesco-Ţigoiu
*(Service de B. Pertussis)*

*(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino »)*

— Manuscrit reçu le 29 septembre 1960 —

Les vaccins associés ont depuis longtemps dépassé l'impasse où ils étaient retenus par les théories concernant l'interférence antigénique. Aujourd'hui il est expérimentalement prouvé par de nombreux auteurs que la compétition antigénique peut être exclue par un dosage judicieux quantitatif et qualitatif des différents antigènes qui entrent dans leur composition.

D'autre part, la prophylaxie spécifique moderne, qui impose l'immunisation des enfants pendant la première année d'existence contre nombre de maladies transmissibles, ne peut être réalisée par le « calendrier des vaccinations », qui doit être appliqué par le réseau sanitaire anti-épidémique sur le terrain, que si nous disposons de vaccins associés.

Nous avons exposé dans deux travaux antérieurs (4, 5) les résultats obtenus par voie expérimentale sur les animaux de laboratoire, ainsi que sur les enfants, avec un bi-vaccin diphtéro-tétanique, préparé dans notre Institut.

Le spécifique épidémiologique de la Roumanie, nous a imposé la préparation d'un tri-vaccin diphtéro-tétano-pertussis, qui est actuellement appliqué sur le terrain.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Notre travail a pour objte de présenter la méthode de préparation du trivaccin et les résultats obtenus par son expérimentation sur les animaux de laboratoire.

Pour la préparation du vaccin associé diphtéro-tétano-pertussis, on a utilisé:

— L'anatoxine diphtérique, préparée d'après la technique de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » (2, 3) dont la valeur antigénique est de 100—120 Lf/ml, le Kf = 5′—10′, la pureté = 60 Lf/mg N. provenant de toxines diphtériques à 8000—10.000 DMM/ml.

— L'anatoxine tétanique préparée, de même, selon la technique de l'Institut « Cantacuzino » (7), avec une valeur antigénique de 10—15 Lf/ml, provenant de toxines tétaniques avec 3.000.000—8.000.000 DMM/ml.

— La purification-concentration des anatoxines se fait sur le mélange des deux anatoxines natives, combinées dans certaines proportions (selon le contenu en Lf/ml de chaque composant), de manière à ce que le produit purifié-concentré résulté puisse être amené, par dilution, à la concentration de 240 Lf/ml anatoxine diphtérique et de minimum 80 UB/ml anatoxine tétanique. Le mélange est précipité par l'acide trichloracétique 20% au pH = 3,0 (électrode en verre). Le précipité obtenu par centrifugation ou sur le tamis d'un filtre-presse, est redissout en solution tampon borate, au pH = 7,4 (d'après PALISH).

Dépigmentation par agitation avec 0,5% charbon actif et filtrage sur papier filtre.

Dilution avec du NaCl 0,85% jusqu'aux titres désirés (240 Lf/ml anatoxine diphtérique et minimum 80 UB/ml anatoxine tétanique). On ajoute du merthiolate 1/10.000 (thiomersal BDH) et on filtre sur filtres Seitz stérilisants.

— L'anatoxine tétanique simple (témoin) a été purifiée à l'acide métaphosphorique (12).

— Le degré de pureté des anatoxines purifiées en mélange ou simple (témoin) s'exprime en Lf/mg N. (dosé selon KJELDAHL).

— L'innocuité des anatoxines purifiées-concentrées est contrôlée (avant l'addition du merthiolate) sur cobayes de 300—350 g, par inoculation de 5 ml par voie sous-cutanée. Les animaux sont tenus sous observation pendant 30—40 jours, durant lesquels leur poids doit augmenter, sans présenter de symptômes d'intoxication diphtérique ou tétanique.

— Le vaccin de *B. pertussis* se prépare avec des souches en phase I, 267/1954, 270/1954, 353/1955, 373/1956, 761/1959, 907/1959, isolées en Roumanie, conservées en état de lyophilisation. Les germes cultivés sur milieu semi-synthétique solide (15) sont suspendus en NaCl 0,85% formolé 0,3%, maintenus pendant 24 heures à 37°C.

Après centrifugation les germes sont suspendus de nouveau en sérum physiologique (NaCl 0,85%) merthiolé 1/10.000, en ajustant la concentration en germes à 240 unités internationales d'opacité (U.I.O.)/ml.

La détoxification des suspensions de *B. pertussis* se contrôle comme suit:

— on inocule par voie souscutanée 4 souris de 15—18 g avec 0,5 ml vaccin *B. pertussis* (concentration en germes = 30 U.I.O./ml);

— on inocule par voie intrapéritonéale 4 souris (même poids), avec 0,5 ml vaccin *B. pertussis* (concentration en germes = 5 U.I.O./ml);

— on considère comme détoxifié le vaccin qui ne tue pas plus d'une souris sur quatre (survie de 75%) de chaque groupe.

L'efficacité du vaccin *B. pertussis* se contrôle par le test KENDRICK (11) et EVANS-PERKINS (8).

— Le phosphate d'aluminium (3) se prépare avec chlorure d'aluminium et phosphate trisodique en proportion stoechiométrique (M/20), lavé 3 fois à l'eau distillée, isotonisée avec du chlorure de sodium. La concentration finale du $PO_4Al$ = 12 mg/ml; pH = 5,5—5,7. On merthiolise 1/10.000 et stérilise 1 heure et 30 minutes à 134°C.

— Une partie (1 volume) d'anatoxine diphtéro-tétanique, purifiée et concentrée, est mélangée à une partie (1 volume) de la suspension de *B. pertussis*, en ajoutant ensuite 2 parties (2 volumes) gel $PO_4Al$.

Finalement, 1 ml trivaccin adsorbé contient: 50—60 Lf anatoxine diphtérique; 20 U.B. anatoxine tétanique; 60 U.I.O. *B. pertussis*; 6 mg $PO_4Al$.

— Le contrôle de l'adsorption se fait par titrage Lf/ml du surnageant.

— L'épreuve de l'innocuité s'effectue sur 4 cobayes de 300—350 g; 2 des cobayes reçoivent (voie souscutanée, flanc) par 2 ml produit, les 2 autres 1 ml par voie souscutanée et 1 ml par voie intramusculaire (cuisse) chacun. Les animaux sont tenus sous observation pendant 30—40 jours; ils doivent augmenter de poids, sans présenter de symptômes d'intoxication diphtérique ou tétanique, ni des ulcérations au niveau de la région inoculée.

— La valeur immunisante des lots de vaccin associé ainsi que des témoins a été mise en évidence par le test de la résistance des animaux inoculés avec une seule injection de 0,1 ml produit (testés envers 100—2000 DMM toxine diphtérique et 100—10.000 DMM toxine tétanique, 30 jours après la vaccination). On a également déterminé comparativement les titres antitoxiques dans les sérums des animaux immunisés avec 0,5 ml vaccin associé et dans les sérums témoins (cobayes vaccinés séparément avec de l'anatoxine diphtérique et tétanique adsorbées).

Afin de poursuivre l'effet renforçant du support minéral, on a inclus dans l'expérience, à titre de témoin, des anatoxines diphtérique et tétanique natives et purifiées, ainsi que le trivaccin fluide (non-adsorbé).

L'efficacité du produit fini est contrôlée du point de vue du composant *B. pertussis* à l'aide des tests KENDRICK et EVANS-PERKINS.

— *Méthode Kendrick* (11): des groupes de 20 souris (10 à 12 g) sont vaccinés par voie intrapéritonéale par une seule inoculation avec les doses: $60 \times 10^6$, $300 \times 10^6$, $1500 \times 10^6$ germes (standard NIH). Après 14 jours, les souris sont infectées par voie intracérébrale avec 100.000 germes *B. pertussis*, souche *Kendrick* 18.323, en volume de 0,03 ml. Les souris témoins sont infectées avec 100.000, 50.000, 10.000, 2000 et 400 germes de la même suspension. Les animaux sont tenus sous observation pendant 14 jours, à partir de la 72-ème heure, notant journellement les souris mortes; le 14-e jour on ajoute aussi les cas de paralysie. Le $ED_{50}$ et le $LD_{50}$ sont calculés selon la méthode REED et MUENCH.

— *Méthode Evans-Perkins* (8): trois groupes de 10 souris de 14 à 16 g sont vaccinés par voie intrapéritonéale par deux inoculations faites à un intervalle de 14 jours, avec $5000 \times 10^6$, $1250 \times 10^6$, $312 \times 10^6$ germes. Dix jours après la seconde dose de vaccin, les souris sont saignées à blanc par sectionnement de l'artère axillaire. Les agglutinations sont effectuées sur des mélanges de 2 sérums selon la méthode FLOSSDORF (9). A des dilutions progressives de sérum, en volume de 0,1 ml, on ajoute 0,1 ml d'une suspension de *B. pertussis* en concentration de $10.000 \times 10^6$ germes/ml. On agite pendant 30 minutes, ensuite les tubes sont maintenus pendant 3 heures à 37° et 20 heures à +4°C. La lecture se fait en tenant les tubes inclinés au-dessus d'un miroir concave placé devant une source de lumière.

RÉSULTATS

On a préparé et expérimenté les 3 dernières années, 10 lots de trivaccin de composition variable et on a établi à la suite des résultats obtenus la formule qui s'utilise à présent pour la production.

I. *Trivaccin diphtéro-tétano-pertussis lot IV.*

— On vaccine des cobayes de 300 g avec 7 types de vaccin préparé dans notre Institut, comme suit:

1. Trivaccin adsorbé 1 ml { 50 Lf. anatoxine diphtérique purifiée; 30 Lf. anatoxine tétanique purifiée; 40 milliards *B. pertussis*; 7 mg $PO_4Al$.
Posologie: 1 seule inoculation souscutanée à 0,1 ml.

2. Trivaccin fluide 1 ml { 50 Lf. anatoxine diphtérique purifiée; 30 Lf. anatoxine tétanique purifiée; 40 milliards de *B. pertussis*.
(Le même vaccin qu'au point 1, sans support minéral)
Posologie: 1 seule inoculation souscutanée à 0,1 ml.

3. A.D.P.A. 1 ml { 50 Lf. anatoxine diphtérique purifiée; 8 mg $PO_4Al$
(ceci représente l'anatoxine diphtérique purifiée-adsorbée sur $PO_4Al$, titrée par rapport au standard international et retenue comme sous-étalon national. Contient 180—200 U.I./ml)
Posologie: 1 seule inoculation souscutanée à 0,1 ml

4. A.D.N. 1 ml { 50 Lf. anatoxine diphtérique native (brute)
Posologie: 1 seule inoculation souscutanée à 0,1 ml

5. A.T.P.A. 1 ml { 30 Lf. anatoxine tétanique purifiée; 8 mg $PO_4Al$
Posologie: 1 seule inoculation souscutanée à 0,1 ml.

6. A.T.N. 1 ml { 30 Lf. anatoxine tétanique native (brute)
Posologie: 1 seule inoculation souscutanée à 0,1 ml

7. A.D.T.P. 1 ml { 50 Lf. anatoxine diphtérique purifiée; 30 Lf. anatoxine tétanique purifiée
Posologie: 1 seule inoculation souscutanée à 0,1 ml

Trente-cinq jours après l'inoculation, les cobayes sont répartis par groupes de 8, en cages séparées:

7 groupes à 8 cobayes vaccinés avec le vaccin No. 1 recevront 100—2000 DMM toxine diphtérique; 7 groupes à 8 cobayes vaccinés avec le vaccin No. 1 recevront 100—10.000 DMM toxine tétanique, et ainsi de suite (Tableau I).

Les animaux sont tenus sous observation pendant 7 jours, en notant les cobayes qui meurent avec phénomènes et lésions caractéristiques d'intoxication diphtérique ou tétanique.

Le pourcentage de survie, pour chaque vaccin, est calculé par rapport aux différentes quantités de toxine diphtérique et tétanique. (Tableau I).

*La valeur immunisante du trivaccin adsorbé s'apprécie comparativement au trivaccin fluide*, du point de vue des composants diphtériques et tétaniques, par rapport aux témoins: anatoxine diphtérique purifiée-adsorbée, anatoxine diphtérique native, anatoxine tétanique purifiée-adsorbée, anatoxine tétanique native, anatoxine diphtérique purifiée associée à l'anatoxine tétanique purifiée.

On a vacciné en même temps 4 séries de cobayes par une seule inoculation de 0,5 ml des vaccins Nos. 1, 2, 3 et 5 et saigné les animaux 40 jours après l'inoculation. Dans les sérums récoltés on a titré l'antitoxine diphtérique et l'antitoxine tétanique (Ehrlich). Les résultats sont exposés dans le tableau I.

*Tableau I*

| D.M.M. Toxine diphtérique | Trivaccin adsorbé (1) | Trivaccin fluide (2) | A.D.P.A. (3) | A.D.N. (4) | A.D.T.P. (7) |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Survivants | | Survivants | Survivants |
| 5 D.M.M. | — | 7/8=87,5% | — | 3/8=37,5% | 0/8= 0 |
| 10 D.M.M. | — | 6/8=75,0% | — | 0/8= 0 | 1/8=12,5% |
| 20 D.M.M. | — | 4/8=50,0% | — | 4/8=50,0% | 0/8= 0 |
| 50 D.M.M. | Survivants | 4/8=50,0% | Survivants | 1/8=12,5% | 1/8=12,5 |
| 100 D.M.M. | 7/8= 87,5% | 0/8= 0 | 8/8=100,0% | — | — |
| 200 D.M.M. | 8/8=100,0% | 0/8= 0 | 8/8=100,0% | — | — |
| 400 D.M.M. | 6/8= 75,0% | — | 8/8=100,0% | — | — |
| 600 D.M.M. | 4/8= 50,0% | — | 6/8= 75,0% | — | — |
| 800 D.M.M. | 4/8= 50,0% | — | 4/8= 50,0% | — | — |
| 1000 D.M.M. | 2/8= 25,0% | — | 6/8= 75,0% | — | — |
| 2000 D.M.M. | 1/8= 12,5% | — | 2/8= 25,0% | — | — |

*Antitoxine diphtérique dans le sérum des cobayes vaccinés*

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Mélange Sérums 1 | 2 U.A./ml | 0,91 U.A./ml | 3 U.A./ml | — | — |
| Mélange Sérums 2 | 1,5 U.A./ml | 0,91 U.A./ml | 3 U.A./ml | — | — |

| D.M.M. Toxine tétanique | Trivaccin adsorbé (1) | Trivaccin fluide (2) | A.T.P.A. (5) | A.T.N. (6) | A.D.T.P. (7) |
|---|---|---|---|---|---|
| 10 D.M.M. | — | Survivants | — | — | Survivants |
| 50 D.M.M. | Survivants | 8/8=100,0% | Survivants | Survivants | 3/8=37,5% |
| 100 D.M.M. | 8/8=100,0% | 5/8= 62,5% | 8/8=100,0% | 8/8=100,0% | 1/8=12,5% |
| 200 D.M.M. | 8/8=100,0% | 5/8= 62,5% | 8/8=100,0% | 3/8= 37,5% | 1/8=12,5% |
| 500 D.M.M. | 8/8=100,0% | 2/8= 25,0% | 8/8=100,0% | 3/8= 37,5% | 0/8= 0 |
| 1000 D.M.M. | 8/8=100,0% | 3/8= 37,5% | 8/8=100,0% | 2/8= 25,0% | 0/8= 0 |
| 2000 D.M.M. | 7/8= 87,5% | — | 8/8=100,0% | — | — — |
| 5000 D.M.M. | 8/8=100,0% | 1/8= 12,5% | 1/8= 12,5% | 1/8= 12,5% | 0/8= 0 |
| 10000 D.M.M. | 7/8= 87,5% | — | 7/8= 87,5% | 1/8= 12,5% | — — |

*Antitoxine tétanique dans le sérum des cobayes vaccinés*

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Mélange Sérums 1 | 1 U.A./ml | 0,5 U.A/ml. | 1 U.A./ml | — | — |
| Mélange Sérums 2 | 0,5 U.A./ml | 0,5 U.A./ml | 0,5 U.A./ml | — | — |

II. *Trivaccin diphtéro-tétanique-pertussis lotV*
On a vacciné des cobayes de 300 g avec 3 types de vaccin, comme suit:

1. Trivaccin adsorbé 1 ml { 50 Lf. anatoxine diphtérique purifiée; 30 U.B.*) anatoxine tétanique; 60 U.O.I.**) *B. pertussis*; 6 mg $PO_4Al$
Posologie: une seule inoculation souscutanée avec 0,1 ml.

2. A.D.P.A. 1 ml { 50 Lf. anatoxine diphtérique purifiée; 8 mg $PO_4Al$
(Ceci représente l'anatoxine diphtérique purifiée-adsorbée sur $PO_4Al$, titrée par rapport au standard international et retenue comme sous-étalon national; contient 180—200 U.I./ml).
Posologie: une seule inoculation souscutanée avec 0,1 ml

3. A.T.P.A. 1 ml { 30 U.B. anatoxine tétanique purifiée; 8 mg $PO_4Al$
Posologie: une seule inoculation souscutanée avec 0,1 ml.

On procède de la même manière que dans l'experience antérieure. Les résultats sont consignés dans le tableau II.

*Tableau II*

| D.M.M. toxine diphtérique | Trivaccin adsorbé (1) | A.D.P.A. (2) | D.M.M. toxine tétanique | Trivaccin adsorbé (1) | A.T.P.A. (3) |
|---|---|---|---|---|---|
| | *Survivants* | *Survivants* | | *Survivants* | *Survivants* |
| 50 D.M.M. | 8/9=88,88% | 7/8=87,50% | 100 D.M.M. | 9/9=100,00% | 8/9= 88,88% |
| 100 D.M.M. | 5/9=55,55% | 7/8=87,50% | 200 D.M.M. | 6/7= 85,71% | 8/8=100,00% |
| 200 D.M.M. | 5/9=55,55% | 6/8=75,00% | 500 D.M.M. | 6/8= 87,50% | 8/9= 88,88% |
| 400 D.M.M. | 4/8=50,00% | 5/8=62,50% | 1000 D.M.M. | 6/7= 85,71% | 8/9= 88,88% |
| 700 D.M.M. | 2/9=22,22% | 2/7=28,57% | 2000 D.M.M. | 4/8= 50,00% | 2/6= 33,33% |
| 1000 D.M.M. | 2/9=22,22% | 1/8=12,50% | 5000 D.M.M. | 3/7= 42,85% | 3/6= 50,00% |

*Antitoxine diphtérique dans le sérum des cobayes vaccinés*

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Mélange sérums 1 | 4 U.A./ml | 1,5 U.A./ml | | | |
| Mélange sérums 2 | 4 U.A./ml | 4 U.A./ml | | | |

III. *La valeur immunisante du trivaccin adsorbé du point de vue de la fraction B. pertussis*, s'apprécie par les méthodes de KENDRICK et EVANS-PERKINS; les résultats obtenus sur 6 lots de trivaccin sont exposés dans le tableau III.

*) Unités blocantes
**) Unités d'opacité internationales.

*Tableau III*

| | Souris survivantes vaccinées avec: | | | E.D.$_{50}$ | L.D$_{50}$ | Efficacité relative | Nombre de germes dans 12 doses protectrices |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1500 × 10$^6$ | 300 × 10$^6$ | 60 × 10$^6$ | | | | |
| Lot 5 | 11/16 | 15/19 | 11/15 | 110×10$^6$ | 3 000 | 1,09 | 88×10$^9$ |
| Lot 5 | 8/16 | 6/17 | 5/16 | 800×10$^6$ | 1 800 | 1,12 | 80×10$^9$ |
| Lot 6 | 9/11 | 10/16 | 12/16 | 60×10$^6$ | 3 000 | 2,00 | 48×10$^9$ |
| Lot 6 | 10/16 | 9/18 | 6/13 | 300×10$^6$ | 1 800 | 1,43 | 68×10$^9$ |
| Lot 7 | 13/16 | 9/17 | 1/14 | 430×10$^6$ | 900 | 1,12 | 80×10$^9$ |
| Lot 7 | 17/18 | 12/19 | 5/20 | 210×10$^6$ | 900 | 0,90 | 106×10$^9$ |
| Lot I | 9/18 | 7/18 | 4/27 | 870×10$^6$ | 300 | 0,81 | 105×10$^9$ |
| Lot II | 13/18 | 8/18 | 2/16 | 600×10$^6$ | 600 | 1,00 | 96×10$^9$ |
| Lot III | 15/16 | 15/18 | 4/17 | 180×10$^6$ | 2 500 | 0,80 | 120×10$^9$ |

| Dose de vaccin inoculée aux souris | Moyenne géométrique des titres agglutinants | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Lot 5 | Lot 6 | Lot 7 | Lot I | Lot II | Lot III |
| 5000×10$^6$ | 2 259 | 2 816 | 2 170 | 1 792 | 2 160 | 960 |
| 1250×10$^6$ | 765 | 665 | 928 | 704 | 680 | 580 |
| 312×10$^6$ | 310 | 296 | 156 | 480 | 60 | 130 |

DISCUSSION

Des protocoles des expériences il ressort nettement:

1. *Du point de vue du composant diphtérique.*

*a)* Le trivaccin adsorbé est nettement supérieur comme valeur immunisante par rapport au vaccin fluide.

Les animaux vaccinés par le trivaccin adsorbé survivent en proportion de 50% à 800 DMM toxine diphtérique, tandis que les animaux vaccinés avec le même *vaccin fluide*, survivent dans la même proportion (50%) seulement à 50 DMM toxine diphtérique. On peut donc conclure que le *trivaccin adsorbé est au moins* 16 *fois plus actif* que le vaccin fluide (les animaux résistent en proportion de 12.5% même à 2000 DMM toxine diphtérique).

*b)* Comparant l'effet immunisant du trivaccin adsorbé, qui est presque égal à celui conféré par le monovaccin antidiphtérique adsorbé, on peut conclure que l'association, selon la formule indiquée, ne donne pas de phénomènes d'interférence entre l'antigène diphtérique et les deux autres composants du trivaccin adsorbé. On peut également déduire que le trivaccin adsorbé, considéré du point de vue composant diphtérique, a un titre de 150 U.I./ml.

*c)* Si l'on compare les pourcentages de survie des animaux, obtenus avec le trivaccin fluide et ceux obtenus avec l'anatoxine diphtérique native, on n'observe pas un renforcement appréciable de l'activité immunisante de l'antigène diphtérique, par la présence de *B. pertussis*.

*d)* L'anatoxine diphtérique purifiée en association avec l'anatoxine tétanique purifiée, est dotée d'une valeur immunisante réduite.

*e)* Le titre de l'antitoxine diphtérique, dans le sang des animaux immunisés par le trivaccin adsorbé est 2 fois plus élevé que le titre constaté chez les animaux immunisés avec le même trivaccin *non-adsorbé*.

2. *Du point de vue de la fraction tétanique.*

*a)* Le trivaccin adsorbé est nettement supérieur comme valeur immunisante par rapport au trivaccin fluide.

Les animaux vaccinés avec le trivaccin adsorbé survivent dans une proportion de 100% à 5000 DMM toxine tétanique, tandis que les animaux vaccinés avec le même trivaccin *fluide*, survivent dans une proportion de 100%, mais seulement à 50 DMM toxine tétanique. On peut conclure que le *trivaccin adsorbé est au moins* 100 *fois plus actif que le vaccin fluide* (les animaux résistent en proportion de 87,5% même à 10.000 DMM toxine tétanique).

*b)* En comparant l'effet immunisant du trivaccin adsorbé avec celui conféré par le monovaccin antitétanique adsorbé, on peut conclure que l'association, selon la formule indiquée, ne donne pas de phénomènes de compétition entre l'antigène tétanique et les deux autres composants du trivaccin adsorbé.

*c)* Si on compare les pourcentages de survie des animaux obtenus avec le trivaccin fluide à ceux obtenus avec l'anatoxine tétanique native, il ressort que l'antigène *B. pertussis* n'exerce pas par sa présence un effet renforçant sur l'antigène tétanique.

*d)* L'anatoxine tétanique purifiée, en association avec l'anatoxine diphtérique purifiée, est dotée d'une valeur immunisante réduite.

*e)* Le titre de l'antitoxine tétanique dans le sang des animaux immunisés avec le trivaccin adsorbé, est presque deux fois plus élevé que le titre des animaux immunisés avec le même trivaccin non-adsorbé.

L'action de l'adjuvant a été expliquée autrefois par un « effet de retardement ». Selon PRIGGE (13) il semble qu'un autre mécanisme intervient, mis en évidence par l'utilisation des adjuvants solubles, c'est-à-dire, la modification de l'état physico-chimique des colloïdes actifs grâce à l'adjuvant. Ces colloïdes sont dispersés de telle manière que chaque molécule devient active, alors

que les molécules de l'antigène non-activés s'agrègent en mycéliums dont l'activité est réduite.

3. *Du point de vue du composant B. pertussis*

Les protocoles d'expérience (test KENDRICK) montrent que le nombre de germes (U.I.O.) compris dans 12 doses protectrices a varié pour les lots de trivaccin contrôlés entre $48 \times 10^9$ et $120 \times 10^9$, avec une moyenne de $88 \times 10^9$. Les résultats de ces titrages nous ont déterminés à établir la concentration en *B. pertussis* du trivaccin à 60 U.I.O./ml., tenant compte que la vaccination des enfants comporte 3 inoculations de 0,5 ml faites à intervalle de 30 jours (dose totale = 90 unités internationales d'opacité).

Selon la méthode d'EVANS-PERKINS les titres des agglutinines, par rapport à la dose de vaccin inoculée, ont varié pour les différents lots contrôlés, comme suit:

| *Dose du vaccin* | *Moyenne géométrique des titres agglutinants* |
|---|---|
| $5000 \times 10^6$ | 2816 — 960 |
| $1250 \times 10^6$ | 665 — 580 |
| $312 \times 10^6$ | 296 — 130 |

Ces valeurs sont comparables aux valeurs obtenues par les auteurs cités (8).

## CONCLUSIONS

— L'association de l'anatoxine diphtérique, de l'anatoxine tétanique et du composant *B. pertussis*, en certaines proportions établies du point de vue qualitatif et quantitatif, ne provoque pas de phénomènes d'interférence.

— Le trivaccin préparé dans les conditions mentionnées présente une haute valeur immunogène, tant en ce qui concerne le composant diphtérique, que le composant tétanique.

— L'association avec l'antigène *B. pertussis* confère une synergie réduite aux antigènes diphtériques et tétaniques.

— Le trivaccin adsorbé possède une valeur immunisante au moins 16 fois plus élevée que celle du vaccin fluide, en ce qui concerne le composant diphtérique et 100 fois plus élevée en ce qui concerne le composant tétanique.

Selon le test intracérébral de KENDRICK, le nombre de germes de *B. pertussis* compris en 12 doses protectrices a été en moyenne de $88 \times 10^9$ (88 U.I.O.).

## BIBLIOGRAPHIE


1. APANAŞCENKO J. N. — Jurn. Microbiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1959, **10,** 137.
2. CALALB GH., SARAGEA A. et MAXIMESCO P. — Arch. Roum. de Pathol. Exp. et de Microbiologie, 1957, **16,** 379.
3. CALALB GH. et coll. — Arch. Roum. de Pathol. Exp. et de Microbiologie, 1958, **17,** 125.
4. CALALB GH. et coll. — Arch. Roum. de Pathol. Exp. et de Microbiologie, 1958, **17,** 545.
5. CALALB GH. et coll. — Arch. Roum. de Pathol. Exp. et de Microbiologie, 1959, **18,** 605.
6. CHEVE J., NICOL L., AMOUREUX, M. GIRARD O. et ZOURBAS J. — III-ème Conf. Int. de Standard. Biol., 1957, Opatija, Jugoslavie.
7. CONDREA P. et coll. — Arch. Roum. de Pathol. Exp. et de Microbiologie, 1957, **16,** 211.
8. EVANS D. G. et PERKINS F. T. — J. Path. Bact., 1953, **66,** 479.
9. FLOSSDORF E. W. — J. Pediat., 1941, **19,** 638.
10. IKIC D. — Third Intern. Meet. of Biol. Standardisation, 1957, Opatija, Jugoslavie.
11. KENDRICK P. — Amer. J. Publ. Hlth., 1947, **37,** 803.
12. KRANZDORF H. et BANC S. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Micro iologie 1957, **16,** 579.

13. Prigge R. — Bull. O.M.S., 1955, **13**, 473.
14. Ungar J. — Third Intern. Meet, of Biol. Standardisation, 1957, Opatija, Jugoslavie.
15. Vainer. H., Faur Y. Ţigoiu-Andreesco V. et Ionesco H. — Arch. Roum. de Pathol. Exp. et de Microbiologie, 1957, **16**, 593.

## СМЕШАННАЯ ВАКЦИНА ПРОТИВ ДИФТЕРИИ, СТОЛБНЯКА И КОКЛЮША

*СООБЩЕНИЕ I-ОЕ*

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

При соединении дифтерийного анатоксина со столбнячным анатоксином и с коклюшной вакциной в пропорциях, установленных с количественной и качественной точек зрения, не наблюдаются явления интерференции (конкуренции).

— Тривакцина, приготовленная в указанных условиях, обладает высокими иммуногенными свойствами, как с точки зрения дифтерийной компоненты, так и с точки зрения столбнячной.

— Соединение с коклюшным антигеном способствует в небольшой степени повышению свойств дифтерийного и столбнячного антигена.

Иммунизирующие свойства адсорбированной тривакцины превосходят свойства жидкой тривакцины не менее чем в 16 раз в отношении дифтерийной компоненты и в 100 раз — в отношении столбнячной компоненты.

— В результате внутримозговой пробы по Кендрик установлено, что 12 защитных доз содержат в среднем $88 \times 10^9$ коклюшных микробов (88 интернациональныхе диниц мутности).

## DER KOMBINIERTE DIPHTHERIE-TETANUS-PERTUSSIS SCHUTZIMPSTOFF

*I. MITTEILUNG*

ZUSAMMENFASSUNG

— Die Verbindung des Diphterietoxoids mit Tetanustoxoid und *B. pertussis* in qualitativ und quantitativ festgelegten Verhältnissen führt nicht zu Interferenzerscheinungen.

— Der unter den angegebenen Bedingungen hergestellte dreifache Schutzimpfstoff weist sowohl hinsichtlich der Diphtherie — als auch der Tetanuskomponente eine hohe immunogene Wirksamkeit auf.

— Die synergische Einwirkung auf die Diphtherie — und Tetanusantigens, infolge ihrer Verbindung mit dem *B. pertussis* — Antigen ist gering.

— Der adsorbierte dreifache Schutzimpfstoff besitzt hinsichtlich der Diphtherie-komponente eine zum mindesten 16 fach und hinsichtlich der Tetanuskomponente eine 100 fach stärkere immunisierende Wirksamkeit als in flüssiger Form.

— Dem intrazerebralen Test nach Kendrick zufolge, betrug die Anzahl der in 12 Schutzdosen enthaltenen Keime von *B. pertussis* durchschnittlich $88 \times 10^9$ (88 I.O.E.).

## ASSOCIATED DIPHTHERIA-TETANUS-PERTUSSIS VACCINE

*NOTE I*

SUMMARY

— The association of diphtheria toxoid with tetanus toxoid and *B. pertussis* in qualitatively and quantitatively determined proportions does not result in the appearance of any phenomena of interference.

— Trivaccine prepared in the conditions reported displays high immunogenic potency as regards the diphtheria and the tetanus components.

— There is little synergism of diphtheria and tetanus antigens following their association with *B. pertussis* antigen.

— The immunogenic potency of adsorbed trivaccine is at least 16 times higher than that of the fluid antigen as regards the diphteria component, and 100 times higher as regards the tetanus component.

— According to Kendrick's intracerebral test, the number of *B. pertussis* germs contained in 12 protecting doses was of $88 \times 10^9$ (88 O.I.U.).

# CONSIDÉRATIONS SUR LES ÉPIDÉMIES STREPTOCOCCIQUES D'ORIGINE ALIMENTAIRE

par

Coralia Baldovin-Agapi, Florica Mihalco, Leia Borşai, Margareta Chiresco, G. E. Panaitesco, T. Grigoriu et Natalia Munteanu

*(Travail de l'Institut «Dr. I. Cantacuzino» — Service des Cocci pathogènes et du Centre Sanitaire Anti-épidémique Gh. Gheorghiu-Dej, Bucarest)*

— Manuscrit reçu le 24 décembre 1959 —

La transmission des infections streptococciques par le lait, a détenu une place assez importante dans l'épidémiologie de ces maladies, aussi bien par le nombre de cas enregistrés, que par la gravité et la grande mortalité observées dans le passé.

Quoique le péril de ces épidémies ait diminué sensiblement à la suite de la pasteurisation du lait, néanmoins, jusqu'au début de la seconde guerre mondiale, ces épidémies étaient encore signalées surtout au Danemark, en Angleterre (6) et aux Etats-Unis (8, 18). Ainsi, Dublin et coll. (1943) montrent que pendant l'intervalle 1917—1941, ont été enregistrées dans l'Etat de New-York, 168 épidémies dues au lait crû, affectant près de 10.000 personnes. Les infections streptococciques (scarlatine, angine) ont réuni 6.812 cas (soit 68,20% du total).

A partir de 1943, on enregistre des épidémies d'infections streptococciques transmises par d'autres aliments que le lait ou à base de lait (crême, gâteaux, glaces). Onze pareilles épidémies ont été décrites aux Etats-Unis, ainsi que dans d'autres pays d'Europe, entre les années 1943—1958 (3, 4, 9, 10, 12, 14, 16, 17) auxquelles s'ajoutent 5 épidémies en Roumanie (1, 2, 5, 19).

Selon Dauer (1957) quatre des 250 épidémies alimentaires totalisant 11.085 cas, pendant l'année 1957 aux Etats Unis, étaient dues aux streptocoques hémolytiques, èt ont réuni environ 1000 cas, soit 1/10.

Les streptocoques pyogènes du groupe A ont été les agents étiologiques des diverses épidémies: les types 2, 3, 11/12, 15/17, 19, 27 et NT ont été rencontrés dans les épidémies transmises par le lait (1936—1943) et les types 1, 2, 5, 15 et 25 dans celles provoquées par des aliments variés.

La période d'incubation, ainsi que les manifestations cliniques ou les complications immédiates et tardives observées dans les cas apparus pendant ces épidémies sont spécifiques aux infections streptococciques, transmises par voie habituelle naso-pharyngienne.

A partir de 1926, les streptocoques apparaissent comme agents étiologiques d'épidémies revêtant les caractères typiques des toxi-infections alimentaires

proprement dites: courte période d'incubation (4 à 5 heures allant jusqu'à 12 heures, selon certains auteurs, ou 5 à 18 heures avec une moyenne de 12 heures, selon d'autres), troubles gastro-intestinaux se manifestant par des nausées, vomissements, crampes et diarrhée. Les streptocoques qui provoquent ces épidémies appartiennent, dans la majorité des cas, au groupe D Lancefield. A part les entérocoques, on a décrit des espèces non-identifiées de streptocoques alpha-hémolytiques et des streptocoques des groupes B ou H (11).

La courte période d'incubation fait supposer que les symptômes sont dus soit à l'ingestion d'une grande quantité de germes vivants, soit à des substances toxiques sécrétées par ces streptocoques, ou bien résultant de leur action sur le substratum nutritif (aliment) où ils se sont multipliés.

Ainsi qu'il ressort de la littérature, les épidémies alimentaires et les toxi-infections à étiologie streptococcique occupent une place relativement réduite dans le chapitre des toxi-infections alimentaires, produites surtout par les *Salmonella* et les staphylocoques (13, 15).

L'étude de ces épidémies est nécessaire pour connaitre le mécanisme épidémiologique indiquant les mesures de prophylaxie, ainsi que pour le diagnostic clinique et bactériologique dont dépend l'application du traitement à la pénicilline, en vue de prévenir les complications immédiates et tardives des streptococcies.

En plus, les conditions quasi-expérimentales de ces épidémies, permettent l'acquisition d'informations précieuses en ce qui concerne le comportement pathogène et épidémiologique des différents types de streptocoques pyogènes.

Entre 1956—1959, on a enregistré en Roumanie 5 épidémies d'angines streptococciques d'origine alimentaire chez des personnes prenant leurs repas en commun.

L'identification des souches de streptocoques hémolytiques provenant de ces épidémies, effectuée au Service des Cocci Pathogènes de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino », a établi que l'une de ces épidémies était due à des streptocoques A6 (5) et les autres, aux streptocoques A11/27.

L'ordre chronologique des épidémies à streptocoques type 11/27 a été le suivant:

Première épidémie en juillet 1955 à Craïova (Birzu et coll. /2/); la deuxième, enregistrée au mois de mai 1956 à Bucarest, fait l'objet de la présente communication; la troisième en juin 1956, décrite par Alexa, Baldovin et Beloiu (1); la quatrième, observée en juin 1958 à Constantza, par Tudor, Enache, Birț et Tunaru (19).

*Description de l'épidémie.* L'épidémie est apparue à Bucarest, dans une collectivité (à caractère temporaire) d'adultes venus de différentes régions du pays, comptant 199 personnes dont 132 hommes et 67 femmes, âgés de 30 à 55 ans.

L'épidémie est survenue brusquement, le 27 mai 1956, avec 72 cas le premier jour, 12 cas le second et 3 le 3-e jour. Le nombre a été de 87 cas sur 207 personnes qui prenaient leur repas à la même cantine, soit 42,00% de ceux qui avaient consommé les mêmes aliments. Huit des 87 personnes habitaient en dehors du foyer, mais prenaient leurs repas à la même cantine.

L'épidémie a eu un caractère explosif: 82,76% du total des cas le premier jour, 13,78% le second et 3,40% le troisième jour.

*Description clinique.* Les manifestations cliniques subjectives et objectives présentées par les malades ont été identiques à celles de l'angine streptococcique: frisson, fièvre, angine rouge ou pultacée, céphalée, asthénie, douleurs lombaires, myalgies, inflammation des ganglions sous-maxillaires. Trois cas ont accusé des douleurs abdominales, nausées, selles diarrhéiques. L'évolution a été en général bénigne, avec une durée de 3 à 4 jours. Vingt-deux malades à formes plus sévères ont été internés à l'hôpital.

*Enquête bactériologique.* On a effectué des récoltes d'exsudats amygdalien et nasal de tous les malades et des contacts, y compris le personnel du foyer. Des streptocoques hémolytiques groupe A type 11/27 ont été mis en évidence chez 73,56% des malades, parmi lesquels se trouvaient des personnes qui avaient reçu un traitement à la pénicilline, avant la récolte. Le même type de streptocoque hémolytique a été trouvé chez 6 des 13 employés de la cantine, dont 3 avec angine.

*Enquête épidémiologique.* Les premières investigations ont relevé les faits suivants qui plaident pour la transmission par une source commune, alimentaire:

— Cas apparus exclusivement chez des personnes qui prenaient leur repas à la cantine.

— Huit cas chez des sujets habitant en dehors du foyer, mais prenant leurs repas à la même cantine.

— Trois autres personnes qui ne fréquentaient pas la cantine, mais habitaient les mêmes chambres que les malades, ont fait l'angine quelques jours plus tard (cas secondaires).

La transmission par voie aérienne était peu probable, vu que plus de 50% des sujets de cette collectivité sont restés indemnes, en dépit de leur cohabitation avec les malades.

L'enquête effectuée à la cantine a établi que des 13 employés, 3 présentaient une angine pultacée et 3 autres étaient des porteurs sains du même type de streptocoque (A11/27). Une femme de charge souffrait d'une sinusite chronique avec coryza aiguë, susceptible d'éliminer des quantités considérables de germes. L'examen bactériologique de la sécrétion du sinus, extraite par le Dr. Lazeanu*, ainsi que de l'exsudat nasal et amygdalien n'ont pas mis en évidence des streptocoques hémolytiques sur milieux d'enrichissement, les analyses ayant été pratiquées après administration de pénicilline.

L'enquête épidémiologique du personnel de la cantine n'a pas révélé, dans les antécédents personnels et hérédo-colatéraux immédiats, des affections dues aux streptocoques hémolytiques. Retenons, toutefois, que le mari de la cuisinière était porteur de streptocoques A11/27.

Contrôlant le mode de préparation et le moment du service des repas on a constaté que le déjeuner était préparé 2 à 3 heures avant d'être servi, et le repas du soir, 5 à 6 heures à l'avance et gardé dans des conditions favorables à la multiplication des germes.

Le contrôle bactériologique des aliments consommés la veille (cornes grecques aux tomates, côtelettes panées avec purée de pommes de terre, salade de laitue et gâteaux à la marmelade) n'a pas été possible, à défaut d'échantillons de ces aliments.

*) Nous présentons par cette voie nos remerciements au dr. M. Lazeanu.

**Epidémies streptococciques d'origine alimentaire**

| Auteur | Année | Proportion des cas | | | Période d'incubation (en heures) |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Nombre consommateurs | Nombre malades | Morbidité % | |
| Getting, Wheeler, Foley | 1943 | 140 | 102 | 72.00 | |
| Bloomfield, Rantz | 1943 | 3000 | 341 | 10.00 | ? |
| Hamburger et all. | 1945 | | 106 | | 24—48 |
| Commission malad. Resp. S.U.A. | 1945 | | | | |
| Rantz, Spink, Boisvert | 1945 | | 250 | | ? |
| Reynell | 1948 | | 64 | 16.00 | ? |
| Brobes et all. | 1953 | | 189 | | ? |
| Cahan, Gaiginschi et all. | 1956 | 480 | 141 | 29.40 | 20—72 |
| Farber, Korff | 1958 | 800 | 600 | 69.80 | 31—38 |
| Alexa, Baldovin et all. | 1956 | 330 | 168 | 47.90 | 48—72 |
| Bîrzu et all. | 1955 | 314 | 169 | 53.80 | 48—72 |
| Tudor et all. | 1959 | | 64 | | 48—72 |
| Observation présente | 1956 | 207 | 87 | 42.00 | ? |

**transmises par différents aliments (lait excépté)**

| Manifestations cliniques | Sources d'infection | Aliments | Types de streptocoques hémolytiques |
|---|---|---|---|
| Angine, scarlatine (25%), troubles digestifs | Sujet en incubation de scarlatine | Jambon contenant des streptocoques A2 | A2 |
| Angine pultacée, scarlatine (25%) | ? | ? | A15 |
| Angine pultacée | Sujet en incubation de sinusite | Tarte aux pommes | A1 |
| Tonsillite, pharyngite | . | | A5 |
| Amygdalite | Porteurs (nez et amygdales) secteur alimentaire | ? | A1 |
| Amygdalite, scarlatine (25%) | Panarice | | Streptocoques hémolytiques |
| Angine | Vendeurs | Glaces | A2 |
| Amygdalite pultacée | ? | Fromage à la pie | A6 |
| Angine | Porteurs (secteur alimentaire) | Salade aux œufs | A26 |
| Angine pultacée | Phlegmon palmaire à streptocoques A 11/27 | Semoule au lait | A 11/27 |
| Angine pultacée | Cuisinière présentant une angine (quelques jours) avant l'épidémie | Semoule au lait | A 11/27 |
| Angine pultacée | Malade et porteurs (secteur alimentaire) | Macaronis au fromage | A 11/27 |
| Angine pultacée | Sinusite chronique | ? | A 11/27 |

Les tentatives d'isoler des streptocoques de la vaisselle (verres, assiettes), des mains du personnel porteur de streptocoques hémolytiques, inclusivement l'employée souffrant de sinusite, sont également restées négatives.

*Prophylaxie* 1. Isolement de tous les malades, soit au foyer, soit à l'hôpital et traitement à la pénicilline.

2. Isolement et assainissement, par la pénicilline, des porteurs de streptocoques hémolytiques, dépistés à la cantine et au foyer.

3. Désinfection du local de la cantine et de la vaisselle. Désinfection continue et finale du foyer.

4. Amélioration des conditions hygiéniques de la cantine.

Le contrôle bactériologique des sécrétions naso-pharyngiennes des anciens malades et porteurs, ainsi que du reste des sujets et personnel du foyer et de la cantine, effectué après le traitement, a révélé l'existence de 27 porteurs de streptocoques hémolytiques. Vingt-trois de ces derniers étaient porteurs de streptocoques appartenant à d'autres groupes sérologiques que le groupe A, et quatre, de streptocoques A11/27, dont un ancien malade, un ancien porteur et deux sujets n'ayant pas subi de traitement à la pénicilline. Ces derniers ont été soumis à un traitement d'assainissement avec cet antibiotique.

## DISCUSSION

L'étude de cette épidémie exige l'analyse d'une série de faits relatifs aux épidémies streptococciques d'origine alimentaire. Dans la discussion qui suit, nous nous appuyons sur les données de la littérature concernant les épidémies streptococciques transmises par d'autres aliments que le lait, mentionnées dans le tableau ci-inclus.

*La morbidité* se situe autour de 50% dans les différentes épidémies; dans de rares cas entre 10—16% et atteint dans deux observations 70%. Dans 3 des 4 épidémies à streptocoques A11/27, la morbidité a été de 42,00%, 47,90% et 53,80%.

La morbidité dépend en grande partie du nombre de germes ingérés. Dans une des épidémies étudiées par nous (1), le personnel de la cantine a participé avec une morbidité de 75%, la moyenne pour l'entière collectivité étant de 47,90%.

Getting, Wheeler et Foley (10), constatent pour une morbidité moyenne de 72%, une proportion de 92,8% et 100% cas parmi les sujets ayant consommé du jambon infecté avec des streptocoques 2 et 3 jours plus tard, intervalle pendant lequel les germes avaient continué à se multiplier dans l'aliment.

Rantz (16) souligne que pour apprécier la morbidité réelle il faut tenir compte des cas sous-cliniques, indécelables par l'examen clinique subjectif et objectif, mais mis en évidence par les tests de laboratoire. Cet auteur a constaté que nombre des sujets infectés au cours de l'épidémie n'ont présenté que des indications de laboratoire (hausse de la leucocytose, de la vitesse de sédimentation des hématies et du titre en anti-streptolysine « O »), indiquant une infection sous-clinique.

*La période d'incubation*, considérée à partir du moment de l'ingestion du repas infectant jusqu'à l'apparition des symptômes, constatée par différents

auteurs, se situe autour de l'incubation moyenne des infections streptococciques, établie statistiquement à 56 heures; elle est identique à la période d'incubation des épidémies transmises par le lait (6).

Dans les diverses observations représentées dans le tableau, la période d'incubation varie entre 24—72 heures.

*Les épidémies* se limitent à 3—5 jours dans toutes les observations, avec un maximum de cas dans les premières 48 heures. Les cas apparus après 5—6 jours sont, en général, des cas secondaires.

*Les formes cliniques* sont représentées dans toutes les épidémies, par des angines streptococciques rouges ou pultacées à symptômes classiques. La scarlatine chez les enfants ou chez les jeunes sujets représente approximativement 25% des cas, d'après certaines observations (4, 10, 17) et un seul cas avec éruption passagère chez un enfant (observation personnelle) (1). Les complications (phlegmon amygdalien, otite moyenne, etc.) étaient observées avant l'apparition de la pénicilline. L'évolution clinique est favorable et la mortalité nulle, grâce aux antibiotiques et sulphonamides.

Il est à remarquer que les troubles digestifs occupent une place réduite à l'exception de l'observation de Getting, Wheeler et Foley (10), qui a déterminé ces auteurs à envisager l'existence d'une entérotoxine streptococcique. A notre connaissance, l'existence d'une pareille toxine n'a pu être démontrée jusqu'à présent chez les streptocoques.

*La source d'infection* est difficile à préciser dans la majorité des observations, vu que les porteurs ou malades dépistés parmi les manipulateurs d'aliments, peuvent être, à leur tour, plutôt les victimes que la cause de l'épidémie. Dans 4 observations (dont deux personnelles), on a pu identifier, parmi ces derniers, des malades ou des sujets en incubation d'infections streptococciques (scarlatine /10/, sinusite /12/, panaris et phlegmon palmaire /1/). Le reste des observations ont toujours révélé des porteurs nasoamygdaliens de streptocoques hémolytiques du type infectant, chez les manipulateurs d'aliments.

*Véhicule de l'infection.* Etant donné que la période d'incubation est plus longue que dans les toxi-infections alimentaires proprement dites, l'aliment infectant ne peut être établi avec certitude que très rarement (10). Dans la grande majorité des cas, son identification est basée sur des probabilités d'ordre épidémiologique.

Les aliments incriminés avec certitude ou probabilité ont été: jambon (10), tartes aux pommes (12), fromage frais (5), œufs en salade (9), semoule au lait (1, 2), macaronis au fromage (19).

Le diagnostic d'une épidémie d'origine alimentaire se base sur les données épidémiologiques: début brusque, durée courte, avec un maximum de cas les premières 48 heures, chez des personnes ayant pris leur repas en commun. La mise en évidence de l'agent étiologique chez les malades, le personnel du secteur alimentaire et éventuellement dans l'aliment, contribue à établir le diagnostic.

Les conditions de préparation des aliments et surtout leur conservation pendant plusieurs heures avant d'être servis, jouent le rôle principal dans ces épidémies. La présence dans le bloc alimentaire de sujets atteints d'infections streptococciques, avant l'apparition de l'épidémie, nous fait supposer que les consommateurs auraient pu ingérer les aliments infectants quelques jours avant l'explosion épidémique.

*Types de streptocoques hémolytiques.* A l'exception d'une seule épidémie (17), où le type n'a pu être précisé, différents types de streptocoques groupe A ont été mis en évidence dans tous les cas, chez les malades, les porteurs du secteur alimentaire ainsi que chez la source d'infection (dans les observations où celle-ci a pu être établie).

Tous ces types de streptocoques pyogènes (1, 2, 5, 6, 11/27, 15 et 25) se sont montrés capables de provoquer des infections du type angine chez des individus de divers âges. Les types 15, 2, 11/27 et un type non-identifié, ont donné un certain nombre de cas de scarlatine seulement dans quatre observations. L'absence de capacité scarlatinogène du type 1, soulignée par RANTZ en Amérique est en contradiction avec les caractères nettement scarlatinogènes et épidémiques de ce même type en Roumanie. FARBER et KORFF notent, de même, le fait que le type 25 qui a provoqué 600 cas d'angine s'est montré dépourvu de propriétés néphritogènes. En ce qui concerne le type 11/27, les souches isolées dans les 4 épidémies citées, présentaient des colonies rough, témoignant d'une dégradation antigénique.

Ces observations montrent, une fois de plus, la grande variabilité de la capacité pathogène des divers types de streptocoques pyogènes, où les différents facteurs toxiques et de virulence, élaborés « in vitro » et « in vivo » sont plutôt eu fonction de *souche* que de *type sérologique.*

*Prophylaxie.* Le mécanisme épidémiologique des infections streptococciques d'origine alimentaire étant identique à celui des toxi-infections alimentaires, en général, leur prophylaxie est conforme aux mesures préconisées pour la prévention des toxi-infections alimentaires.

## CONCLUSIONS

On décrit une épidémie d'angines streptococciques d'origine alimentaire, provoquée par des streptocoques groupe A type 11/27, affectant 42,00% d'un total de 207 personnes, âgées de 30—55 ans, qui prenaient leur repas à la même cantine.

L'enquête bactériologique effectuée parmi le personel de la cantine a mis en évidence 3 cas d'angine et 3 porteurs sains, présentant le même type de streptocoque hémolytique. La source probable d'infection était une employée de la cantine avec une sinusite maxillaire chronique.

L'épidémie décrite est la seconde, en ordre chronologique, des 4 épidémies alimentaires causées par ce type de streptocoque, dans l'intervalle 1956—1959, en Roumanie.

Le travail contient des considérations sur les épidémies alimentaires provoquées, ces dernières années, par les streptocoques pyogènes, dans différents pays.

## BIBLIOGRAPHIE

1. ALEXA I., BALDOVIN C. et BELOIU I. — Studii şi Cercet. Med., Ed. Căilor Ferate, Buc., 1958, p. 161.
2. BÎRZU I., ZAHARIA C., MARTIAN I. et GIUCA ST. — Microbiol. Parazitol. Epidemiol., 1960, **5**, 261.
3. BROBES S., SLEJSKA F. et ZAHRADNICKI J. — Cs. Hyg. Epidemiol., Mikrobiol., 1953, **2**, 456.
4. BLOOMFIELD A. L. et RANTZ L. A. — J. Amer. Med. Association, 1943, **121**, 315.

5. Cahan A., Gaiginschi A., Bîrzu A. et al. — Microbiol., Parazitol. Epidemiol., 1956, **2**, 57.
6. Camps F. E. et Miller Wood J. L. — Lancet, 1936, **2**, 756.
7. Dauer C. D. — Publ. Health Rep., 1958, **73**, 681.
8. Dublin T. D., Rogers E. F. A., Perkins J. E. et Groves E. N. — Amer. J. Publ. Health, 1943, **33**, 157.
9. Farber R. E. et Korff F. A. — Publ. Health Rep., 1958, **73**, 303.
10. Getting V. A., Wheeler S. M. et Foley G. E. — Amer. J. Publ. Health., 1943, **33**, 1217.
11. Getting V. A., Rubenstein A. D. et Foley G. A. — Amer. J. Publ. Health, 1944, **34**, 833.
12. Hamburger M. Jr., Johnson Green M. et Hamburger V. G. — J. Inf. Dis., 1945, **77**, 96.
13. Hobbs B. C. — Food poisoning and food Hygiene — London, 1953.
14. Jacobi J. — Klin. Wschrft., 1948, **26**, 705.
15. Nestoresco N. et Popovici M. — Toxiinfecţiile alimentare. Ed. Med., Bucureşti, 1959.
16. Rantz L. A., Spink V. V. et Boisvert P. J. — Arch. Int. Med., 1945, **76**, 278.
17. Reynell B. M. — J. Hyg., 1948, **46**, 148.
18. Stebbins E. L., Ingraham H. S. et Reed E. A. — Amer. J. Publ. Health, 1937, **27**, 1259.
19. Tudor V., Enache St., Birţ M., Tunaru C. — Rev. Sanitară Militară, 1960 (sous presse).

## О ВСПЫШКАХ СТРЕПТОКОККОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ АЛИМЕНТАРНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Описывают вспышку стрептококковых ангин алиментарного происхождения, вызванную стрептококками группы А, типа 11/27, охватившую 42,00% из общего числа 207 лиц, в возрасте 30—35 лет, питающихся в той-же столовке.

Бактериологическое обследование выявило среди персонала столовки 3 заболевания ангиной и 3 здоровых носителя с тем-же типом гемолитического стрептококка, которых считают зараженными в течении вспышки. Вероятным источником инфекции являлась одна из служащих столовой, страдающая хроническим синузитом, у которой не удалось выявить стрептококка, ибо она обследовалась после назначения пенициллина.

Описываемая вспышка является второй в хронологическом порядке, из 4 алиментарных вспышек, вызванных данным типом стрептококка в РНР в течении 1956—1959 гг.

Работа содержит соображения об алиментарных вспышках вызванных пиогенными стрептококками в разных странах, в последние годы. Подчеркивают факт, что хотя данные вспышки основаны на идентичном эпидемиологическом механизме, как и пищевые токсико-инфекции, однако они отличаются от последн с их в связи их инкубационным периодом и клинической симптоматологией, характерными для стрептококковых заболеваний, передаваемых капельным путем, при которых пищеварительные нарушения занимают ничтожное место или вовсе отсутствуют.

## BETRACHTUNGEN ÜBER NAHRUNGSMITTELBEDINGTE EPIDEMIEN VON STREPTOKOKKENINFEKTIONEN

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine nahrungsmittelbedingte Epidemie von Streptokokkenangina beschrieben, die durch Streptokokken der Gruppe A Typus 11/27 hervorgerufen wurde. Von insgesamt 207 Personen im Alter von 30—35 Jahren, die ihre Mahlzeiten in derselben Kantine einnahmen, erkrankten 42,00%.

Bakteriologische Untersuchungen führten zur Aufdeckung von 3 Anginafällen und von 3 gesunden Keimträgern mit dem gleichen Typus von hämolytischen Streptokokken unter dem Personal der Kantine. Es wird angenommen, dass die betreffenden Personen während der Epidemie infiziert wurden. Die wahrscheinliche Infektionsquelle scheint eine an chronischer Sinusitis leidende Angestellte der Kantine gewesen zu sein. Der *Streptococcus* konnte in diesem Falle aber nicht nachgewiesen werden, da die Untersuchung erst nach einer Penizillinbehandlung durchgeführt wurde.

Die beschriebene Epidemie ist in chronologischer Reihenfolge die zweite von 4 von demselben Streptokokkentypus, während der Zeitspanne 1956—1959 in Rumänien verursachten nahrungsmittelbedingten Epidemien.

Die Arbeit enthält Betrachtungen über die in den letzten Jahren von pyogenen Streptokokken in verschiedenen Ländern hervorgerufenen nahrungsmittelbedingten Epidemien. Es wird hervorgehoben, dass solche Epidemien, obwohl sie durch den gleichen epidemiologischen Mechanismus zustandekommen wie die Nahrungsmittelvergiftungen, sich von diesen durch eine den auf dem Luftwege übertragenen Streptokokkeninfektionen eigentümliche Inkubationsperiode und klinische Symptomatologie unterscheiden, wobei Verdauungsstörungen eine geringe oder überhaupt keine Rolle spielen.

## CONSIDERATIONS ON FOOD-BORNE STREPTOCOCCAL EPIDEMICS

SUMMARY

An epidemic of food-borne streptococcal angina is described. It was caused by streptococci of A group, type 11/27, and involved 42.00% of a total of 207 subjects aged 30—35 years, who were taking their meals in the same canteen.

Bacteriological investigations demonstrated the existence of 3 cases of angina and of 3 healthy carriers harbouring the same type of streptococcus among the staff of the canteen. These subjects are considered to have contracted the infection during the epidemic. The source of the infection probably was a female member of the staff, who was suffering from chronic sinusitis. However, the presence of the streptococcus could not be demonstrated in this case since the patient was examined after undergoing penicillin treatment.

The epidemic described is the second in chronological order of four food-borne epidemics caused by this type of streptococcus in Roumania during the period 1956—1959.

The paper contains comments on food-borne epidemics caused by pyogenic streptococci in various countries during recent years. It is pointed out that although the epidemiological mechanism in such cases is similar to that in food poisoning, these epidemics differ from the latter by a period of incubation and a clinical symptomatology characteristic of air-borne streptococcal infections in which digestive disorders play a minor part or are altogether absent.

# CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE LA STRUCTURE ANTIGÉNIQUE DES *BRUCELLA*

## I. SÉPARATION DE L'ANTIGÈNE M ET DE QUELQUES COMPLEXES QUI LE CONTIENNENT

par

CELLA BARBER, OFELIA DIMITRIU, TH. VASILESCO et AL. CERBU

*(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Services de Biochimie et des Zoonoses)*

— Manuscrit reçu le 24 novembre 1960 —

La nécessité de trouver des méthodes permettant la différenciation des souches de *Brucella* — dont les propriétés varient selon la source animale de laquelle elles ont été isolées — est actuelle, malgré le très grand nombre d'investigations concernant le problème.

L'opinion que les types de *Brucella* ne sont pas des espèces distinctes, mais seulement des variantes, est de plus en plus fréquente. RENOUX dans un travail récent (19) montre qu'il n'y a pas de corrélation exacte entre les deux méthodes de classification utilisées jusqu'à présent: la comparaison de l'action bactériostatique du bleu de méthylène, du vert Janus et de l'érythromycine, avec les épreuves de classification par les tests à la thyonine et fuchsine basique.

L'étude de la structure chimique des antigènes des *Brucella* a été souvent abordée; des essais de séparer par voie chimique les différents antigènes, n'ont pas apporté des précisions sur les éventuelles différences dans la structure des germes. Tous les antigènes étudiés jusqu'à présent ont été isolés de toutes les souches de *Brucella*, dans des complexes presque identiques, et des précipitations croisées ont été obtenues avec tous les antisérums brucelleux.

Dès 1932 WILSON et MILES (24) avaient différencié sérologiquement *Br. melitensis* de *Br. suis* et *abortus* par les proportions d'antigènes A et M différemment distribués, mais MILES et PIRIE (10) n'ont pas réussi à isoler par des méthodes chimiques les substances A et M.

Les antigènes isolés par ces auteurs étaient constitués de lipides, d'acides nucléiques, de nucléoprotéines et d'un complexe (SSS) assez ressemblant du point de vue composition chimique à l'antigène glucidolipidique isolé des *Brucella* par différents autres auteurs (4, 5, 6, 14).

De composition chimique identique est aussi l'antigène de PENNEL et HUDDLESON (17), préparé par digestion trypsique.

Des essais de différenciation, par voie chimique, des fractions antigéniques isolées des différentes souches ont été effectués — sans succès d'ailleurs — par SILVERMAN et ELBERG (20); les auteurs trouvent dans les antigènes « natifs » isolés de toutes les souches de *Brucella*, des bandes d'adsorption correspondant à des bases puriniques et pyrimidiniques.

Dubrovskaia (6, 7) dans l'étude faite sur les constituants chimiques des *Brucella*, trouve que les antigènes glucidolipidiques contiennent un IV-ème composant qui, à part une protéine, est constitué d'acide désoxyribonucléique. Ce quatrième composant (insoluble dans l'hydrolysat CLH n/1, pour le dosage des lipides) avait été signalé par l'un d'entre nous dans des recherches concernant les antigènes glucidolipidiques des *Brucella*, dès 1938 (5, 14); les variations de composition de ces antigènes — pour le même type de *Brucella* — d'une récolte à l'autre, étaient du même ordre de grandeur que celles d'un type à l'autre.

Seules les techniques modernes d'identification qualitative étaient en mesure d'élucider le problème.

L'étude concernant les relations antigènes-anticorps des *Brucella*, par la technique de double diffusion en gel d'agar, a été abordée avec autorité par Olitzki et Sulitzeanu (11, 12, 13, 21).

Utilisant la même méthode, Bruce et Jones (2) ont montré qu'un antigène réagissant avec le sérum des animaux infectés par des *Brucella* peut être facilement isolé de *Br. melitensis*, mais non pas de *Br. suis* ou *abortus*. Le plus actif des antigènes utilisés par les auteurs était l'antigène glucidolipidique avec lequel ils obtenaient 3 lignes de précipitation en gel; les auteurs attribuaient l'impossibilité d'extraire le même type d'antigène de *Br. abortus*, soit à la petite quantité d'antigène existante dans cette souche, soit à la déficience de la technique d'extraction.

Par la même méthode et presque en même temps, Carrère et coll. (4) ont abordé le problème des antigènes des *Brucella*. Les auteurs étudient comparativement des antigènes obtenus par le broyage des germes et par leur désintégration par ultrasons — qu'ils considèrent des endoantigènes — avec les antigènes glucidolipidiques; ils trouvent que les endoantigènes des trois espèces sont identiques et que chacun des antigènes constitue une seule fraction, par le fait qu'on obtient une seule ligne de précipitation avec le sérum immun obtenu avec les germes.

Les auteurs ne peuvent néanmoins donner une explication satisfaisante en ce qui concerne le comportement de l'antigène *Abortus* broyé, avec lequel ils n'obtiennent aucune ligne de précipitation en gel. D'après Carrère et coll. l'antigène glucidolipidique est complètement différent de l'endoantigène et ne possède pas de groupement commun avec ce dernier puisque on n'a même pas noté de réaction d'identité partielle; les antigènes glucidolipidiques des espèces *Melitensis* et *Abortus*, selon les mêmes auteurs, sont antigéniquement identiques, tandis que l'antigène glucidolipidique *Suis* est nettement différent, ce qui tend à séparer le sérotype *Suis* du sérotype *Abortus*.

Récemment Olitzki (13) reprenant les recherches effectuées en 1957 et 1958 (11, 21, 12) dans le but de déterminer d'éventuelles différences dans la structure antigénique des *Brucella*, teste différents antisérums par différents antigènes de *Brucella*, et mesure la capacité précipitante des sérums par rapport aux antigènes homologues et hétérologues, en utilisant des tests d'absorption et des titrations quantitatives; tous les résultats aboutissent à la même conclusion, c'est-à-dire que les antigènes de *Brucella suis* révélés dans les recherches antérieures (11) sont présents dans toutes les souches du genre *Brucella* et ont été isolés par la désintégration des germes par ultrasons. Les six antigènes identifiés

— parfois plusieurs — diffèrent par leur concentration relative dans les extraits des diverses espèces; aucun des antigènes n'a été spécifique pour une espèce particulière; mais pour la démonstration de ces résultats, des sérums hyperimmuns sont indispensables.

Les méthodes utilisées jusqu'à présent dans les différentes recherches concernant l'extraction des antigènes des *Brucella*, ont abouti à l'obtention de complexes antigéniques à rendements comparables, de toutes les souches; aucune méthode n'a permis la mise en évidence — par voie chimique — d'un rapport quantitatif entre les antigènes M et A, rapport qui ressort des réactions sérologiques (d'absorption et de précipitation). Ni les extraits obtenus par désintégration à l'aide des ultrasons — c'est-à-dire par la méthode qui détruit la cellule libérant tous les endoantigènes — ni les antigènes glucidolipidiques utilisés par la plupart des auteurs, n'ont permis d'obtenir des différences quantitatives dans les antigènes isolés à partir des différentes souches de *Brucella*. Les rendements de tous les extraits d'une souche à l'autre, ne varient pas plus que d'une récolte à l'autre de la même souche. L'antigène « natif » bien connu de MILES et PIRIE, récemment repris par PHILIPS, BRAUN et PLESCIA (1, 16) se comporte de la même manière.

Une méthode sélective qui permette d'isoler, qualitativement ou quantitativement, au moins un des antigènes dominants dans la *Brucella*, n'a pas encore été décrite.

Afin d'obtenir de nouvelles informations concernant les antigènes des *Brucella*, on a étudié dans le présent travail: l'antigène glucidolipidique utilisé par la plupart des auteurs (2, 4, 5, 6, 9) et l'antigène « natif » (10, 24) comparativement à certains extraits de *Brucella*, non-utilisés jusqu'à présent.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Des cultures de 48 h lavées par centrifugation et acétonées ont été utilisées pour l'extraction des antigènes.

Souches utilisées: *Br. suis* 1330 *(Mineapolis)*, souche de référence

*Br. suis* 6 *(Montpellier)*

*Br. suis* 156, souche indigène isolée en 1953 d'une orchite de chez un verrat

*Br. abortus* 544 (souche de référence) OMS

*Br. abortus* V 672, reçue de Sofia en 1955 TDKI

*Br. melitensis Foster*, obtenue en 1953 I.P.I.A. retypisée sur des sérums agglutinants monovalents adsorbés; agglutinée 1/800 par le sérum antimelitensis et zéro par le sérum antiabortus.

Les sérums précipitants ont été préparés sur lapin par injections intraveineuses de 5 milliards germes (phase « s » phénolés 0,5%) à 5 jours d'intervalle.

Quelques-uns des lots de lapins ont donné de puissants sérums précipitants après 6 injections intraveineuses; d'autres lots ont nécessité des réinoculations, les sérums étant intensivement agglutinants, mais faiblement précipitants.

Les antigènes suivants ont été utilisés: 1. l'antigène glucidolipidique, analysé dans des recherches antérieures (5, 14), 2. l'antigène « natif » isolé à l'aide du phénol 2% selon la technique de MILES et PIRIE (10), 3. un extrait obtenu à l'aide du phénol 90%, 4. un antigène obtenu (après séparation de l'extrait

phénol 90%) des germes lavés à l'acétone et soumis à une extraction par une solution 0,90% de ClNa contenant 20% méthanol, selon des techniques décrites ailleurs (3), et enfin, 5. un antigène obtenu à l'aide d'une solution 2% désoxycholate de sodium. La technique de cette extraction est, brièvement, la suivante:

3g germes acétonés sont triturés avec 100 cc sol 2% désoxycholate de sodium, la suspension étant maintenue à 37° pendant 24 heures avec de fréquentes agitations.

Pour séparer les germes du surnageant qui contient l'antigène, on centrifuge à 16000 t/m. Après une dialyse de 48 h contre de l'eau courante et 24 h contre de l'eau distilllée, on sépare par centrifugation le matériel insoluble et le surnageant est stérilisé par filtre Seitz.

Pour l'analyse des antigènes on a utilisé les techniques classiques courantes. La chromatographie des polysaccharides a été executée sur papier Whatman Nos. 1 et 4, utilisant le butanol-acide acétique-eau (40:10:50) comme liquide d'irrigation et le phtalate d'aniline comme révélateur. Les réactions de double diffusion en gel d'agar ont été conduites selon la technique d'Ouchterlony. Pour chacune des souches de *Brucella* analysées, tant les récoltes utilisées pour l'extraction des antigènes que les antisérums analysés ont été nombreux.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

Du tableau résumatif des rendements des antigènes, isolés de 3 souches de *Br. suis*, deux *Br. abortus* et une *Br. melitensis*, on remarque que seulement un de ces antigènes — notamment celui obtenu par le phénol 90% — présente des différences importantes en ce qui concerne les quantités dans lesquelles il a été isolé des différentes souches de *Brucella.*

Tandis que les antigènes glucidolipidiques, les antigènes « natifs », les nucléoprotéines isolées des germes traités antérieurement par le phénol 90% et les antigènes obtenus à l'aide du désoxycholate de sodium sol. 2% sont isolés avec des rendements comparables de toutes les *Brucella, l'antigène séparé par le phénol* 90% *est obtenu de Br. melitensis dans des quantités qui dépassent* 3—4 *ois les quantités obtenues de Br. abortus ou Br. suis.*

*Tableau*

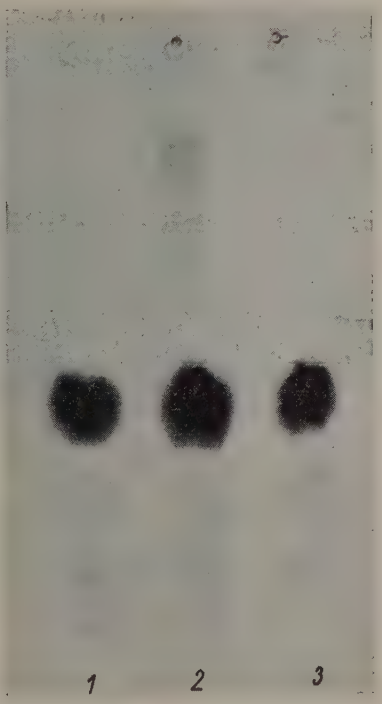
**Rendements des antigènes extraits des *Brucella* par différentes méthodes**

| Souches | Antigènes extraits par: | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Phénol 90% g% | Sol. ClNa 0.9% g% | Phénol 2% (antigène « natif ») g% | Ac. trichloracétique 10% (antigène glucidolipidique) g% | Sol. désoxycholate de Na 2% g% |
| *Br. suis* 6 | 2.20 | 3,00—4,00 | 4.00 | — | 12.00 |
| *Br. suis* 156 | 2.40 | 3.50 | 3.50 | — | 12.00 |
| *Br. suis* 1330 | 2.90 | 3.00 | 3.80 | 7.00 | 9.35 |
| *Br. abortus* 544 | 1.90—2.6 | 3.30—4.00 | 3.40 | 6.30 | 9.60 |
| *Br. melitensis Foster* | 8—9.30 | 3.00—3.80 | 4.10 | 6.30 | 12.80 |

1. Cet antigène réagit fortement en gel d'agar, aussi bien avec le sérum homologue qu'avec les sérums hétérologues; il donne une ligne de précipitation caractéristique tant par son intensité que par sa courbure vers la cuve d'antigène, ce qui permet de le reconnaître dans tous les complexes qui le contiennent; isolé de *Br. melitensis* avec un rendement de 8—9 g % il a été obtenu de *Br. abortus* dans des proportions qui ne dépassent pas 2,6 g % et de *Br. suis* avec des rendements variant de 2,3 à 3 g%.

L'analyse chimique de cet antigène prouve qu'il s'agit d'un polysaccharide constitué de glucose avec de très petites quantités de mannose et d'arabinose; l'antigène isolé de *Br. suis* et *Br. abortus* est moins riche en azote (2—2,5g%) que celui isolé de *Br. melitensis* qui contient environ 4 g % (photographie 1).

Du fait que tous les antigènes étudiés par nous contiennent les mêmes polysaccharides — même ceux avec lesquels on n'obtient pas la ligne de précipitation caractéristique — nous ne savons encore si le polysaccharide ou le composant azoté qui l'accompagne imprime sa spécificité à l'antigène. Le rendement de cet antigène qu'on obtient dans des proportions d'environ 4 fois plus grandes de *Brucella melitensis* que de *Br. suis* ou *Br. abortus*, ainsi que *l'image caractéristique* qu'on obtient dans les précipitations en gel d'agar avec les antisérums homologues et hétérologues nous font croire qu'il s'agit de la fraction M décrite par WILSON et MILES, qui n'a pas encore été isolée jusqu'à présent par voie chimique.

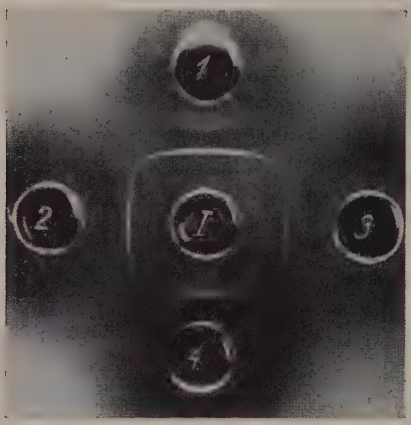



*Photographie 1.* — Chromatographie des polyaccharides separés par le phénol 90%. 1 — *Br. melitensis*; 2 — *Br. suis* 1330; 3 — *Br. abortus*.

Quand l'antigène M isolé de *Br. melitensis* est mis dans un réservoir central et différents antisérums dans des réservoirs latéraux, les lignes de précipitation en gel se raccordent en une réaction d'identité totale; lorsqu'un antisérum, soit de *Br. melitensis*, *abortus* ou *suis*, est placé dans le réservoir central et dans les réservoirs latéraux sont placés les antigènes M séparés de différentes souches de *Brucella*, on obtient une image très caractéristique illustrant les proportions dans lesquelles cet antigène est distribué dans les différents germes. (Photos. 2 et 3).

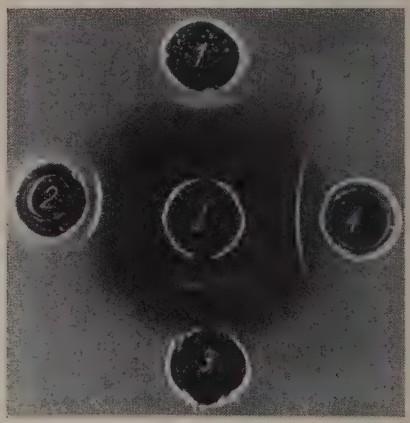
L'antigéne M fait partie comme composant majeur de la constitution du complexe isolé à l'aide du désoxycholate de sodium à partir de *Br. melitensis ;* il entre dans la constitution de l'antigène glucidolipidique et dans une plus petite proportion dans la constitution de l'antigène « natif » de cette même souche.

En concordance avec la proportion d'antigène M isolé par le phénol 90% des souches de *Br. suis* et *abortus* (environ 1/4 de la quantité isolée de *Br. melitensis*) l'antigène a été identifié dans la constitution des antigènes glucidolipidiques d'*Abortus* et de *Suis* et dans les complexes isolés à l'aide du désoxycholate de sodium de *Br. abortus*. Malgré que le complexe au désoxycholate de




*Photographie 2.* — Antigène M, isolé de *Br. melitensis*. Réagit de la même manière avec tous les antisérums brucelliques *(suis 6, suis 1330, abortus* et *melitensis)*. On reconnaît sa courbure caractéristique (vers la cuve contenant l'antigène) dans tous les complexes qui contiennent l'antigène M.

I — Antigène phénol *melit*; 1 —Antisérum *Br. melit*; 2 — Antisérum *Br. suis* 6; 3 — Antisérum *Br. abortus*; 4 — Antisérum *Br. suis* 1330.




*Photographie 3.* — L'antigène M se trouve en proportions différentes dans les *Br. suis*, *Br. abortus* et *Br. melitensis*. La nucléoprotéine (3) qui est extraite des *Brucella* après séparation de l'antigène M, impurifie l'antigène M de la *Br. suis* et *abortus*. A cause de la nécessité de concentrer cet antigène, (qui existe en petites quantités dans les *Br. abortus* et *suis)*, les bandes de précipitation données par les impuretés deviennent visibles.

I — Antisérum *Br. suis 6*; 1 — Antigène phénol *suis 6*; 2 —Antigène phénol *abortus*; 3 —Antigène II S 156; 4 — Antigène phénol *melit.*

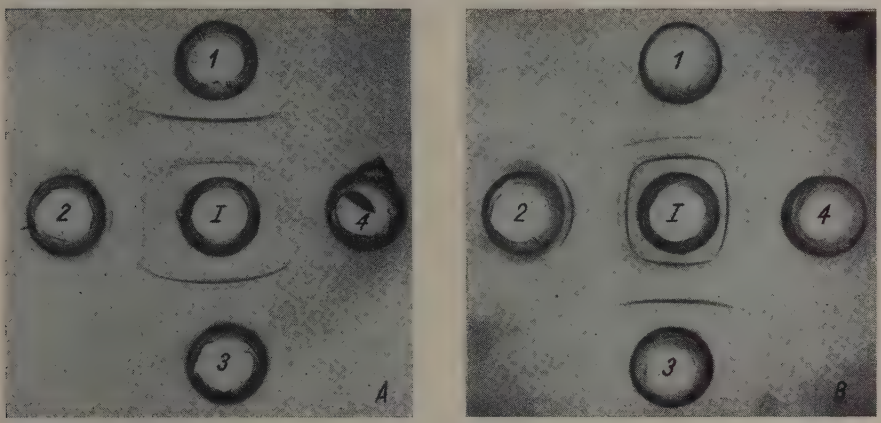
*Br. suis* donne, dans la réaction de diffusion en gel, au moins six lignes de précipitation (tout comme les antigènes ultrasonnés de O et S), l'antigène M n'a pas toujours été décelé dans ce complexe; donc il est plus difficile de le séparer par cette méthode des souches de *Br. suis*. Facilement décelable par la courbure de sa ligne de précipitation dirigée vers le réservoir d'antigène et près de celui-ci, l'antigène M isolé aussi bien séparément que dans les complexes qui le contiennent, correspond aux anticorps qui apparaissent parmi les premiers dans les sérums immuns (v. photo 5 *Br. abortus*).

Il faut se rappeler que pour obtenir des informations valables concernant les relations entre les différentes souches de *Brucella*, des sérums hyperimmuns sont indispensables, ainsi que l'ont préconisé Olitzki et Sulitzeanu.

Seuls les tests obtenus avec des sérums hyperimmuns permettent d'éviter des interprétations erronnées comme celles formulées par Carrère et coll. (4).

Ces auteurs concluent sur des résultats obtenus avec des sérums préparés par une seule inoculation et utilisent comme repère le titre agglutinant des sérums.

Dans nos expériences où l'on a utilisé de nombreux antisérums à des titres précipitants très variés, un antisérum *Br. abortus*, à titre agglutinant important




*Photographie 4.* — L'antisérum *Br. melitensis*, ainsi que l'antisérum *Br. suis*, réagissent avec les complexes extraits avec du désoxycholate de sodium de toutes les *Brucella*, par 6—7 bandes de précipitation. La présence de l'antigène M dans ces complexes est évidente pour les *Br. melitensis* et *Br. abortus* dans les proportions connues. L'extrait de *Br. suis* ne contient pas la fraction M.

Photo A: I — Antisérum *Br. melitensis*; 1 — Antigène désox. *melitensis*, 2 — Antigène désox. *abortus*; 3 — Antigène désox. *suis* 6; 4 — Antigène désox. *suis* 1330.
Photo B: I — Antisérum *Br. suis*, 1 — Antigène désox. *suis 6*; 2 — Antigène désox. *abortus*; 3 — Antigène désox. *melit*, 4 — Antigène désox. *suis 1330*.

(1:3400) mais pauvre en précipitines, a permis la mise en évidence de l'apparition des anticorps qui correspondent à l'antigène M avant les autres anticorps, par la présence d'une seule ligne de précipitation (Photo 5) avec des antigènes qui donnent avec des sérums puissants, au moins 4 à 6 lignes de précipitation. (Photos 4 A et B).

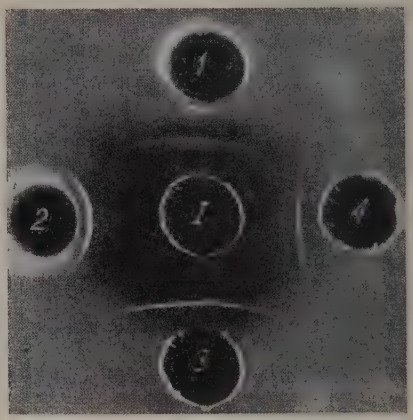
Le même antisérum permet l'illustration des proportions dans lesquelles l'*antigène* M est distribué dans les différents complexes isolés de *Br. abortus* (homologue) en comparaison avec la distribution de l'antigène M dans les différents complexes isolés de *Br. melitensis* (hétérologue).

Le fait que les antisérums de *Br. abortus* obtenus parfois par nous ont été moins puissants que ceux de *Br. suis* ou *melitensis* s'expliquerait par le récent travail de Foster et Ribi (8) qui prouvent que les antigènes *Br. abortus* sont moins solubles que ceux de *Br. melitensis ;* les auteurs essayent de libérer l'antigène dans une forme soluble à l'aide d'agents chimiques faibles et constatent que la grande partie de l'activité responsable de l'immunité reste étroitement liée aux parois cellulaires.

2. L'antigène séparé de toutes les *Brucella* après l'écartement de l'antigène M, donne 1—2 lignes de précipitation en gel aussi bien avec les sérums homologues qu'avec les sérums hétérologues; ces lignes de précipitation sont communes à deux des lignes de précipitation obtenues avec les antigènes « natifs » et avec les complexes isolés à l'aide du désoxycholate de sodium. Cet antigène est constitué de nucléoprotéines (déterminées par dosage d'azote, de phosphore

*Photographie 5.* — Sérum *antiabortus* faible. Réagit par une seule bande de précipitation tant avec les antigènes homologues qu'avec les antigènes hétérologues. Le dernier des anticorps apparu paraît être celui qui correspond à l'antigène M, distribué en quantités différentes dans la *Br. abortus* par rapport à la *Br. melitensis.*

I — Antisérum *Br. abortus*; 1 — Antigène phénol *abortus*, 2 — Antigène désox. *abortus*, 3 — Antigène glucidolip. *abortus*,— 4 Antigène glucidolip. *melit.* —Antigène désox. *melit.*; 6—Antigène phénol *melit.*,




*Photographie 6.* — Réaction de précipitation d'un antisérum *Suis* avec des antigènes glucidolipidiques (homologues et hétérologues), qui montre les proportions de l'antigène M dans les complexes glucidolipidiques des 3 *Brucella.* L'antigène M de la souche *melitensis* (hétérologue) sert de témoin.

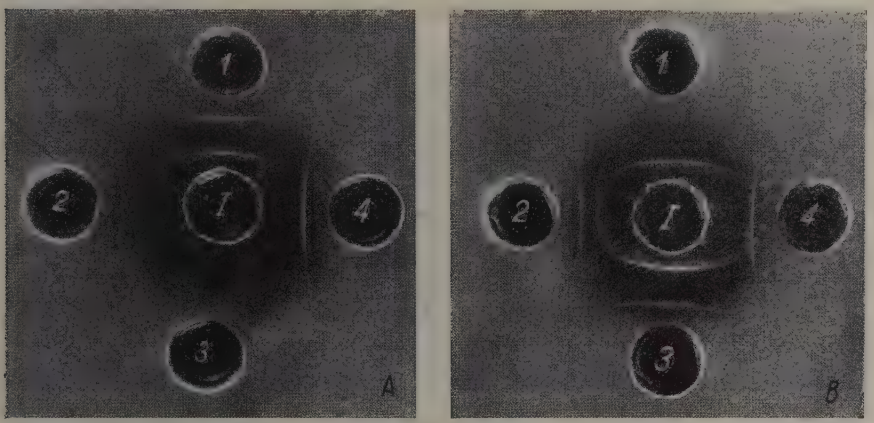
I — Antisérum *suis*; 1 — Antigène glucidolip. *suis*, 2 — Antigène glucidolip. *abortus*; 3—antigène phénol *melit.*; 4 — Antigène glucidolip. *melit.*

et par précipitation des bases puriniques) liées à des polysaccharides et les rendements qu'on obtient sont comparatifs pour toutes les souches de *Brucella* utilisées (3—4g%).

3. L'antigène « natif » de Miles et Pirie (10, 15) isolé à l'aide du phénol 0,5% ou 2%, étudié récemment par Braun, Plescia et coll (1, 16) est riche en nucléoprotéines mais contient aussi une grande quantité de polysaccharides. (Photo 8).

Le polysaccharide est le même que celui qui se trouve dans la constitution de tous les antigènes isolés par nous de toutes les souches de *Brucella* étudiées; avec des sérums puissants cet antigène donne 5 lignes de précipitation, dont 2 sont communes aux bandes de précipitation obtenues avec les nucléoprotéines décrites antérieurement. L'*antigène* M caractéristique par la bande de précipitation — la courbe vers le réservoir d'antigène et près de celui-ci — se retrouve dans les antigènes « natifs » en quantités plus élevées dans l'extrait de *melitensis* que dans celui de *suis* ou *abortus.*

4. L'antigène glucidolipidique, isolé de *Br. melitensis* a permis l'obtention de 3 lignes de précipitation avec des sérums forts, dans les travaux de BRUCE et JONES, mais les auteurs n'ont pu obtenir à partir de *Br. abortus* et *suis* un antigène diffusible. A l'avis des auteurs, l'antigène dans ces souches est, ou




*Photographie 7.* — L'antisérum de la *Br. suis* réagit avec les antigènes isolés de la *Br. melitensis*, de la même manière que l'antisérum *melitensis*. Dans tous les antigènes la fraction M réagit par une bande caractéristique courbée vers la cuve contenant l'antigène. Le complexe isolé de la *Br. suis* avec une solution 2% désoxycholate de sodium fait exception par le manque de cette fraction. Néanmoins, cette absence n'empêche pas l'apparition des 6 bandes de précipitation.

Photo A: 1 — Antisérum *Br. melitensis*; 1 — Antigène désox. *melitensis*; 2 — Antigène glucidolip. *melit.*; 3 — Antigène désox. *suis*, 4 — Antigène phénol *melit.*

Photo B: 1 — Antisérum *Br. suis*; 2 — Antigène désox. *suis*; 2 — Antigène glucidolip. *melit*; 3 — Antigène désox. *melit*; 4 — Antigène phénol *melit.*

bien en doses très réduites, ou bien il n'est pas libéré par la méthode utilisée.

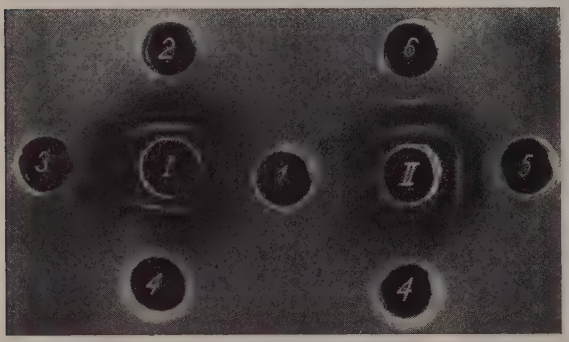
L'antigène glucidolipidique, dont la constitution est bien connue (5, 6, 7, 9) et qui a été utilisé par CARRÈRE et coll (4) et par BRUCE et JONES (2) dans des recherches employant la technique de diffusion en gel, a conduit les auteurs à des conclusions différentes, vu les sérums faibles qu'ils ont utilisés.

Employant le même antigène, CARRÈRE et coll. obtiennent des résultats desquels ils concluent que les espèces de *Br. melitensis* et *abortus* sont identiques, alors que le *Br. suis* est nettement différent; la méthode permettrait de différencier le sérotype *suis* du sérotype *abortus*. Selon ces auteurs, l'antigène glucidolipidique lequel donne une seule ligne de précipitation en gel d'agar, diffère totalement des endoantigènes et ne possède pas de groupement commun avec ces derniers, du fait que — prétendent les auteurs — on n'a pu noter aucune réaction d'identité, même partielle, avec les endoantigènes.

Expérimentant sur des sérums hyperimmuns — on n'insiste pas suffisamment sur la nécessité de tels sérums — les résultats obtenus par nous avec antigènes différents prouvent l'existence de différences seulement quantitatives

dans la distribution de tous les antigènes des différentes souches de *Brucella*. (Photos 7 A et B).

L'antigène glucidolipidique, isolé de *Br. melitensis* — qui de toutes les *Brucella* contient les antigènes les plus solubles — réagit avec tous les antisérums *(abortus, suis* et *melitensis)* par 4—5 lignes de précipitation en fonction du titre précipitant du sérum. L'antigène M aisément reconnaissable par les caractéristiques décrites, entre dans une plus grande concentration dans le complexe glucidolipidique isolé de *Br. melitensis* que dans les complexes glucidolipidiques isolés de *Br. suis* et *Br. abortus ;* les autres lignes de précipitation sont communes aux antigènes isolés par les différentes méthodes de diverses souches de *Brucella*. (Photographie 8).




*Photographie 8.* — Le nombre des bandes de précipitation dépend en premier lieu du titre précipitant du sérum; l'antigène glucidolipidique (1) isolé de la *Br. melitensis* réagit par plusieures bandes de précipitation avec l'antisérum *suis* qu'avec le sérum homologue (4) qui est un sérum ancien. L'extrait avec désoxycholate de sodium de *Br. abortus* (4) donne des bandes de précipitation plus nombreuses et plus intenses avec l'antisérum *suis* qu'avec l'antisérum *melitensis* (qui èst un sérum de date plus ancienne).

I. — Antisérum *Br. suis* 6; II — Antisérum *melitensis F;* 1 — Antigène glucidolip. *melit;* 2 — Antigène désox. *suis;* 3 — Antigène „natif" *suis;* 4 — Antigène désox. *abortus;* — 5 Antigène „natif" *melit.;* 6 — Antigène désox. *melit.*

5. A l'aide du désoxycholate de sodium on a isolé a partir de toutes les *Brucella* étudiées, des complexes antigéniques, qui d'après le nombre de lignes de précipitation obtenues en gel d'agar avec des sérums homologues et hétérologues (6—7 lignes) corresponderaient au surnageant des germes désintégrés par ultrasons utilisés par OLITZKI et SULITZEANU.

Cet antigène séparé dans des quantités comparables de toutes les souches, contient comme tous les autres complexes antigéniques étudiés, des proportions variées de glucides (les mêmes dans toutes les souches), des nucléoprotéines et des lipides, ces dernières dans des quantités assez réduites. Du point de vue qualitatif néanmoins, le complexe isolé de *Br. melitensis* se distingue facilement des complexes isolés par la même méthode de *Br. suis* ou *Br. abortus*, grâce à la présence de la fraction M qui le caractérise. Du total de 6—7 lignes de précipitation qu'on obtient entre ce complexe et les antisérums, tant homologues que hétérologues, la ligne caractéristique, proche du réservoir d'antigène et courbée vers celui-ci, est la plus forte des lignes de précipitation; les antigènes obtenus à l'aide du désoxycholate sol. 2% de *Br. suis* ne contiennent pas toujours cette fraction, ce qui prouve son insolubilité dans la sol. de désoxycholate, tandis que l'acide trichloracétique la dissout. D'ailleurs l'antisérum de *Br. suis* donne une forte précipitation en gel avec la fraction M isolée à l'aide du désoxycholate de la *Br. melitensis*, prouvant ainsi la présence des anticorps correspondant à l'antigène M caractéristique dans cet antisérum.

Les extraits obtenus avec le désoxycholate de *Br. abortus* contiennent l'antigène M dans des proportions beaucoup plus réduites que les extraits de *Br. melitensis ;* les proportions sont analogues à celles dont l'antigène M de *Br. abortus* a été séparé par le phénol 90%. La majorité des autres lignes de précipitation obtenues avec les complexes isolés par le désoxycholate sont communes à tous les antigènes et à tous les antisérums brucelliques.

## CONCLUSIONS

Généralement les mêmes antigènes, variables seulement en fonction de la méthode d'extraction utilisée, ont été isolés de 3 souches de *Br. suis*, une de *Br. melitensis* et 2 de *Br. abortus*.

Testés par la méthode de la double diffusion en gel d'agar avec des sérums hyperimmuns homologues et hétérologues, les antigènes ont réagi par le même nombre de lignes de précipitation, différant seulement en fonction de la complexité des antigènes utilisés et de leur concentration.

A l'aide du phénol 90% on a séparé quantitativement l'antigène M qui entre dans la constitution de *Br. melitensis* dans une proportion approximativement 4 fois plus grande que dans *Br. abortus* ou *Br. suis ;* cet antigène donne une ligne de précipitation en gel très caractéristique avec tous les antisérums de *Brucella* et il est facilement reconnaissable dans tous les complexes qui le contiennent.

Du point de vue composition chimique, l'antigène M est un polysaccharide constitué de glucose avec traces de mannose et arabinose, associé à une fraction azotée plus importante dans le cas de *Br. melitensis* (4%) que dans *Br. suis* ou *abortus* (2—2,5%). Le problème de savoir lequel des composants imprime sa spécificité à l'antigène, fait l'objet de recherches en cours.

L'antigène M isolé, dans les proportions énoncées, de *Br. suis* et *abortus* (3 à 4 fois moindres que chez *Br. melitensis*) entre dans la constitution de la majorité des antigènes séparés des *Brucella* par des méthodes différentes; l'antigène glucidolipidique et les antigènes « natifs » le contiennent dans les proportions dans lesquelles l'antigène M est distribué dans les cellules des différentes souches de *Brucella*.

Le complexe obtenu à l'aide du désoxycholate de *Br. melitensis* et *Br. abortus*, complexe qui par le nombre de lignes de précipitation que l'on obtient en gel d'agar correspond aux extraits des germes désintégrés par ultrasons, contient l'antigène M caractéristique, tandis que le complexe séparé par cette méthode de *Br. suis* ne le contient pas toujours. Ce fait montre seulement l'insolubilité de l'antigène M de *Br. suis* dans le désoxycholate, tandis que sa solubilité est démontrée dans l'acide trichloracétique, dans le phénol 2% et phénol 90%, dans les proportions dans lesquelles il est distribué dans la *Br. suis*. Les antisérums de *Br. suis* contiennent toujours les anticorps correspondant à cet antigène, ce qui est prouvé par le fait que ces antisérums réagissent tout aussi fortement avec la fraction M isolée de *Br. melitensis*, que l'antisérum *Melitensis* homologue.

De ces résultats il ressort que toutes les souches de *Brucella* contiennent les mêmes antigènes parmi lesquels la fraction M est comprise, dans des

proportions très différentes (environ 4 fois plus abondante dans *Br. melitensis* que dans *Br. suis* et *abortus*) ; d'ailleurs les antigènes de *Br. melitensis* sont beaucoup plus solubles que ceux des autres *Brucella*.

De nos recherches, qui ont impliqué de nombreux lots d'antigènes et beaucoup d'antisérums, se dégage également la conclusion, que pour établir les relations antigènes-anticorps dans l'étude des *Brucella* et pour éviter des erreurs d'interprétation, il est absolument indispensable d'utiliser des sérums hyperimmuns.

BIBLIOGRAPHIE


1. Braun W., Burrows J. W. et Philips J. A. — Nature, 1957, **180,** 1356.
2. Bruce W. et Jones L. M. — Bull. World Health Organization, 1958, **19,** 187.
3. Barber C., Zilisteanu E. et Nafta I. — Arch. Roum de Path. Exp. et de Microbiologie, 1957, **16,** 573.
4. Carrère L., Roux J. et Serre A. — Ann. de l'Inst. Pasteur, 1958, **95,** 588.
5. Dâmboviceanu A., Barber C., Pop A. et Marinov I. — C.R. Soc. Biol., 1938, **127,** 736.
6. Dubrovskaia I. I. — Biohimia, 1951, **16,** 41.
7. Dubrovskaia I. I. — Biohimia, 1954, **19,** 58.
8. Foster J. et Ribi E. — Bact. Proc., 1960. Abstracts of the 60th Ann. Meeting, Philadelphia, 1088.
9. Lisbonne M. et Monnier P. — C.R. Soc. Biol., 1936. **123,** 1114.
10. Miles A. et Pirie N. W. — Brit. J. Exp. Path., 1939. 20, **10,** 83.
11. Olitzki A. et Sulitzeanu D. — Brit. J. Exp. Path., 1958, **39,** 219.
12. Olitzki A. L. — Brit. J. Exp. Path., 1959. **40,** 432.
13. Olitzki A. L. — Boll. dell'Ist. Sieroterap. Milanese, 1960. **39,** 97.
14. Pop Al., Dâmboviceanu A., Barber C. et Marinov I. — C.R. Soc. Biol., 1938, **127,** 733.
15. Paterson J. S., Pirie N. W. et Stableforth A. W. — Brit. J. Exp. Path., 1947, **28,** 223.
16. Philiphs J. H., Braun W. et Plescia J. — Nature, 1958, **181,** 573.
17. Pennel R. B. et Huddleson I. F. — J. Exp. Med., 1938, **48,** 73 et 83.
18. Renoux G. — Ann. de l'Inst. Pasteur, 1958. **94,** 179.
19. Renoux G. — Arch. de l'Inst. Pasteur de Tunis, 1960, **37,** 23.
20. Silverman S. et Elberg S. — J. Immunol., 1950. **65,** 163.
21. Sulitzeanu D. — Brit. J. Exp. Med., 1958. **39,** 367.
22. Vershilova P. A. et Kokorin I. N. — J. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1954. No. 1. 27.
23. Wanghelovici M., Dâmboviceanu A., Barber C. et Pop A. — C.R. Soc. Biol., 1938, **128,** 738.
24. Wilson G. S. et Miles A. A. — Brit. J. Exp. Path., 1932. **13,** 1.
25. Wundt W. — Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankheiten, 1958, **145,** 235.


## К ИЗУЧЕНИЮ АНТИГЕННОЙ СТРУКТУРЫ *БРУЦЕЛЛ*

### ВЫДЕЛЕНИЕ М-АНТИГЕНА И КОМПЛЕКСОВ, СОДЕРЖАЩИХ ДАННЫЙ АНТИГЕН


КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Из *Brucella suis, abortus* и *melitensis* получены путем экстракций разные антигены; при испытании данных антигенов в диффузии в агаровом геле, в присутствии гомологических и гетерологических гипериммунных сывороток, получено одинаковое количество линий преципитаций (2—7), зависящих только от применяемого антигена, что доказывает наличие тех же антигенов во всех штаммах бруцелл.

При помощи 90%-ного фенола отделен М-антиген, входящий в состав бруцеллы *Melitensis* в 4 раза большем количестве (8—9 гр%), чем в состав бруцелл *Abortus* или *Suis* (1,9—3 гр.%).

Антиген М дает характерную линию преципитаций в геле со всеми противобруцеллезными сыворотками, по которой его можно легко опознать во всех комплексах, в которых он содержится: в глюцидо-липидном антигене, в «нативном» антигене и в экстракте, полученном при помощи 2%-ного раствора дезоксихолата натрия; характерен изгиб преципитационной линии, направленный к чашечке, содержащей антиген и ее приближение к этой чашечке.

## BEITRÄGE ZUM STUDIUM DER ANTIGENSTRUKTUR BEI *BRUCELLEN*

### DIE ISOLIERUNG DES M-ANTIGENS UND GEWISSER KOMPLEXE, DIE ES ENTHALTEN.

ZUSAMMENFASSUNG

Aus *Brucella suis, abortus* und *melitensis* wurden verschiedene Antigene extrahiert. Bei der Reaktion mit homologen und heterologen hyperimmunen Sera in Agargel, ergaben diese Antigene die gleiche Anzahl von Präzipitationslinien (2—7), die nur von der Art des verwendeten Antigens abhängig war, was die Anwesenheit der gleichen Antigene bei allen *Brucella* stämmen beweist.

Vermittels 90-prozentigen Phenols wurde das M-Antigen abgetrennt, dessen relativer Anteil an der Zusammensetzung der *Brucella melitensis* etwa 4 mal höher ist (8—9 g %) als bei der *Brucella abortus* oder *suis* (1, 9—3 g %).

Das M-Antigen ergibt bei der Präzipitation in Gel mit allen Brucella Antisera eine charakteristische Linie und ist in allen Komplexen, die es enthalten (Gluzidolipidantigen, „natives" Antigen und mit einer 2-prozentigen Natriumdesoxycholatlösung erhaltener Extrakt) leicht an der auf den Antigenbehälter zu gerichteten Krümmung der Präzipitationslinie und an deren Lage in der Nähe dieses Behälters zu erkennen.

## CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF THE ANTIGENIC STRUCTURE OF *BRUCELLAE*

### ISOLATION OF THE M ANTIGEN AND OF COMPLEXES CONTAINING IT

SUMMARY

Various antigens extracted from *Brucella suis, abortus* and *melitensis* were tested by means of the agar gel diffusion method *versus* homologous and heterologous hyperimmune sera and reacted by the same number of precipitation lines (2—7) which was exclusively dependent on the type of antigen used. This proves the presence of the same antigens in all *brucella* strains.

The M antigen was separated by means of 90 per cent phenol extraction. It is present in *Brucella melitensis* in about 4 time larger amounts (8—9 g. per cent) than in *Brucella abortus* or *suis* (1.9—3 g. per cent).

The M antigen yields a characteristic precipitation line in gel with all brucella antisera. It may be easily recognized in all complexes containing it (glucidolipidic antigen, „native" antigen, and 2 per cent sodium desoxycholate solution extract), owing to the curving of the precipitation line towards the antigen well and to the situation of this line in close proximity to the latter.

# CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE LA MOBILITÉ DES COLONIES BACTÉRIENNES

## NOTE III. LE RÔLE DES CILS.

par

A. SĂSĂRMAN

*(Travail de l'Institut « Dr. Cantacuzino » — Service des Cultures Microbiennes)*

— Manuscrit reçu le 20 septembre 1960 —

Les colonies bactériennes mobiles ont attiré l'attention de nombreux auteurs, à cause de l'inédit qu'elles présentaient par rapport au reste des colonies microbiennes; néamoins, le mécanisme de la mobilité des colonies n'a pas été élucidé jusqu'à ces dernières années (6,7). Même les travaux récents, qui présentent des observations intéressantes en ce qui concerne ce phénomène, n'abordent que timidement le problème du mécanisme.

Ainsi, GILLERT (2,3) a décrit, dans deux notes consécutives, une série d'observations intéressantes sur le comportement des colonies mobiles, réussissant à surprendre, parmi d'autres phénomènes, le changement du sens de la rotation d'une colonie. Il a également décrit le comportement des colonies annulaires, qui peuvent présenter une rotation semblable à celle des colonies circulaires.

SERSTOBOEV (8) a isolé 6 souches possédant des colonies mobiles, dont 5 de l'air athmosphérique et une souche provenant d'un produit pathologique. Basé sur certaines différences biochimiques par rapport aux autres espèces chez lesquelles on avait décrit des colonies mobiles, l'auteur a essayé d'individualiser une nouvelle espèce — *Bacillus coloniomobile*. L'auteur note un phénomène intéressant chez ces germes: les bacilles étaient immobiles en sérum physiologique, mobiles en solution 1,1—1,6% NaCl et de nouveau immobiles en solution 1,73% NaCl ainsi qu'à des concentrations plus fortes. Cette particularité expliquerait, selon SERSTOBOEV, la synchronisation du mouvement des cils, qui serait à la base du mouvement de la colonie entière.

KIENHOLZ (4) a isolé du contenu intestinal d'un cobaye une bactérie présentant des colonies mobiles; par la suite on a constaté qu'il s'agissait du *B. circulans*.

Nous désirons également attirer l'attention sur un travail plus ancien de CISTOVICI (1), ignoré dans certaines bibliographies, qui a le mérite d'avoir isolé et étudié comparativement un nombre considérable de bactéries à colonies mobiles. En effet, CISTOVICI a isolé du sol, par une technique simple, 158 souches bactériennes avec des colonies mobiles, représentant 2,4% des épreuves ensemencées. De même, il a isolé de l'air athmosphérique 25 bactéries à colonies mobiles. Les germes respectifs étaient sporulés, fermentaient faiblement les

glucides, différaient du point de vue sérologique et possédaient des antigènes spécifiques.

Dans une note antérieure (7) nous avons émis l'hypothèse qu'à la base du phénomène de la mobilité des colonies bactériennes se trouverait une légère agglutination des corps microbiens chez les espèces bactériennes possédant un appareil cilliaire puissant. Vu que notre hypothèse est apparue totalement déformée, à cause d'une erreur de traduction, nous tenons à répéter, en résumé, l'explication que nous avons donnée au phénomène: les germes qui forment la colonie mobile, en présence d'un milieu à viscosité élevée (gélose) adhéreraient par leurs corps, grâce à un potentiel électrique de surface réduit; en même temps, à cause d'un appareil cilliaire puissant, le groupe entier est mis en mouvement.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons ensemencé une culture de *Proteus* HX19 sur gélose nutritive dans laquelle l'on avait incorporé du sérum anti-*Proteus* OX19. On a observé la formation de colonies mobiles typiques, qui n'apparaissent jamais sur la boîte témoin, sans sérum. De cette manière nous avons réussi à provoquer expérimentalement la formation de colonies mobiles, ce qui confirme la justesse de l'hypothèse émise et éclaircit en grande mesure le problème du mécanisme de la mobilité des colonies microbiennes.

Il restait à fournir une dernière confirmation sur le rôle des cils, étant donné que la nature des forces qui maintiennent l'unité de la colonie à été élucidée jusqu'à un certain point. Certains auteurs ont montré qu'une série de substances tensioactives, qui empêchent le mouvement des bacilles isolés, empêchent également le mouvement des colonies mobiles. Ces données ne prouvent pas tant le rôle des cils dans le mouvement des colonies bactériennes, mais plutôt le fait que les mécanismes qui interviennent dans le mouvement d'une cellule sont les mêmes que ceux qui sont responsables de la mobilité de la colonie.

Pourtant, il existe la possibilité d'intervenir spécifiquement sur les cils par un sérum antiflagellaire.

Dans le présent travail on donne les résultats obtenus par l'étude de l'effet du sérum antiflagellaire sur la mobilité des colonies microbiennes.

La souche étudiée a été un *Proteus* HX19. On a utilisé un sérum antiproteus OX19 et un sérum anti-Proteus HX19 absorbé (antiflagellaire pur).

On a préparé des boîtes Petri avec gélose 1% à laquelle on a incorporé:

1) du sérum antiproteus OX19 2,5% + sérum antiproteus HX19 2,5%
2) du sérum antiproteus HX19 2,5% + sérum normal de lapin 2,5%
3) du sérum antiproteus OX19 2,5% + sérum normal de lapin 2,5%
4) du sérum normal de lapin 5%
5) du sérum physiologique 5%

Les boîtes ont été ensemencées en déposant sur un point de la circonférence du milieu de culture une goutte d'une culture de 24 heures en bouillon de *Proteus* HX19; ensuite incubation à 37°C.

Après 10 heures, dans les boîtes contenant du sérum antiproteus OX19 + HX19 la culture s'est developpée au niveau de l'aire de l'inoculum sans aucune tendance à invader la surface du milieu. La culture dévelopée sur milieu contenant du sérum antiproteus HX19 présentait le même aspect; la culture sur milieu avec du sérum antiproteus OX19 présentait de nombreuses colonies mobiles avec tendance prononcée à l'invasion du milieu. Les cultures sur gélose

avec sérum normal de lapin et sérum physiologique présentaient l'aspect d'invasion de la surface, propre au *Proteus*.

Il résulte que le sérum antiproteus HX19 absorbé (anti-H pur) empêche la mobilité des colonies bactériennes.

Etant donné que ce sérum était est un sérum anti-flagellaire pur, les résultats prouvent nettement le rôle des cils dans le phénomène de mobilité des colonies bactériennes. Ces données représentent un argument en plus contre l'hypothèse de PIJPER (5), qui nie le rôle des cils dans la mobilité des bactéries.

De même, nous ne pouvons être d'accord avec l'affirmation selon laquelle à la base de la mobilité des colonies bactériennes se trouverait la synchronisation du mouvement des cils. Nous considérons que le déplacement d'une colonie de bacilles légèrement agglutinés par leurs corps se fait dans la direction de la résultante des forces représentées par les cils, sans que la synchronisation de leur mouvement soit nécessaire, mais seulement l'existence d'un appareil cilliaire puissant (7). Tant que l'activité des cils est intense (cellules jeunes), il est plus difficile d'expliquer l'état de repos que le mouvement d'une colonie mobile. La colonie une fois en mouvement, le frottement avec le milieu de culture mènera à la disposition du reste des cils dans le sens du mouvement, ce qui contribuera à l'augmentation de la vitesse de déplacement, à cause de la superposition des directions du mouvement d'un plus grand nombre de cils que celui du début.

Ainsi, on peut considérer que le problème du mécanisme de la mobilité des colonies bactériennes a été élucidé en grande mesure, restant seule à être éclaircie la question de la prédominance d'un certain sens de la rotation des colonies.

## CONCLUSIONS

1. On a reproduit le phénomène de la mobilité des colonies bactériennes par l'incubation d'une souche de *Proteus* HX19 sur gélose 1% contenant du sérum antiproteus OX19.

2. Le sérum antiproteus HX19 (anti-flagellaire pur) empêche la mobilité des colonies bactériennes, ainsi que le phénomène d'invasion. Ces données confirment le rôle des cils dans la mobilité des colonies bactériennes.

3. Selon l'auteur, le déplacement d'une colonie mobile a lieu dans la direction de la résultante des forces représentées par les cils, sans que la synchronisation de leurs mouvement soit nécessaire.

## BIBLIOGRAPHIE

1. CISTOVICI, G. N. — Mikrobiologhia, 1945, **15**, 379
2. GILLERT, K. E. — Naturwischenschaften, 1956, **43**, 262
3. GILLERT, K. E. — Zbl. Bakt. Paras. Infek. Hyg. I. Orig., 1957, **167**, 598.
4. KIENHOLZ. — Archiv. Hyg. Bakt., 1959, **143**, 485.
5. PIJPER, A. — Erg. Mikrob. Imunität u. Exp. Ther., 1957, **30**, 37
6. SĂSĂRMAN, A., GANEA, V. et DOSPINA, M., — Arch. Roum de Path. Exp. et de Microb., 1957, **16**, 395.
7. SĂSĂRMAN, A., GANEA, V. et DOSPINA, M. — Arch. Roum de Path. Exp. et de Microb., 1959, **18**, 307.
8. SERSTOBOEV, K. N. — Mikrobiologhia, 1958, **27**, 641.

## К ИЗУЧЕНИЮ ПОДВИЖНОСТИ БАКТЕРИЙНЫХ КОЛОНИЙ

### СООБЩЕНИЕ III-ЕЕ. РОЛЬ ЖГУТИКОВ


### КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

1. Авторам удалось воспроизвести явление подвижности бактерийных колоний, выращивая штамм протея HX19 на чашках с 1%-ным агаром, содержащим сыворотку против протея OX19.

2. Сыворотка против протея HX19 (чисто противожгутиковая) препятствует подвижности бактерийных колоний, также как и ползанию протея. Этот факт подтверждает значение жгутиков для подвижности бактерийных колоний.

3. Передвижение подвижной колонии происходит в направлении результанты сил, представляемых жгутиками, причем для такого передвижения нет надобности в синхронизации движений жгутиков, а только в наличии мощного жгутикового аппарата.


## BEITRÄGE ZUM STUDIUM DER BEWEGLICHKEIT VON BAKTERIEN-KOLONIEN

### III. MITTEILUNG. DIE ROLLE DER GEISSELN.


### ZUSAMMENFASSUNG

1. Durch Bebrütung eines Stammes von *Proteus* HX19 in Petrischalen mit 1-prozentigem Agar unter Zusatz eines Proteus OX19 Antiserums, gelang es den Verfassern das Phänomen der Beweglichkeit von Bakterienkolonien zu reproduzieren.

2. Proteus HX19 Antiserum, das ausschliesslich auf die Geisseln wirkt, verhindert die Beweglichkeit der Bakterienkolonien sowie das Ausschwärmen. Dadurch wird die Rolle der Geisseln bei der Beweglichkeit der Bakterienkolonien bestätigt.

3. Die Verschiebung einer beweglichen Kolonie erfolgt in der Richtung der Resultante der durch die Geisseln dargestellten Kräfte. Dabei brauchen die Bewegungen der Geisseln nicht gleichzeitig stattfinden, sondern es muss nur ein starker Geisselapparat vorhanden sein.


## CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF THE MOTILITY OF BACTERIAL COLONIES

### NOTE III. THE ROLE OF CILIA.


### SUMMARY

1. The authors were able to reproduce the phenomenon of bacterial colony motility by incubating a strain of *Proteus* HX19 in dishes containing 1 per cent agar to which Proteus OX19 antiserum had been added.

2. Proteus HX19 antiserum (pure anti-flagellar serum) inhibits the motility of bacterial colonies as well as the invasion phenomenon. This confirms the role of the cilia in the motility of bacterial colonies.

3. Motile colonies move in the direction of the resultant of the forces represented by the cilia. Synchronism of movements in the latter is not required, provided a powerful ciliary apparatus is present.

# CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE LA STRUCTURE ANTIGÉNIQUE DES STREPTOCOQUES NON-HÉMOLYTIQUES (VIRIDANS)

## I. MÉTHODES D'EXTRACTION DES ANTIGÈNES ET DES POLYSACCHARIDES

par

CELLA BARBER, CORALIA BALDOVIN-AGAPI, IRINA BELOIU et ILEANA CAFFÉ

*(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Services de Biochimie générale et des Cocci pathogènes)*

— Manuscrit reçu le 26 juin 1960 —

Si l'on dispose d'un nombre considérable d'informations sur la structure antigénique des streptocoques hémolytiques, les données concernant la structure antigénique des streptocoques non-hémolytiques et viridans sont, par contre, peu nombreuses.

Dans l'étape actuelle de nos connaissances, il est douteux que ces germes possèdent des polysaccharides ou d'autres antigènes à spécificité de groupe, ainsi qu'il a été démontré pour les streptocoques des groupes Lancefield.

L'existence de nombreux types a été, par contre, démontrée dans le cadre des diverses espèces de streptocoques viridans et non-hémolytiques. Ainsi, SHERMAN, NIVEN et SMILEY (10) ont trouvé deux types différents de *Str. salivarius* et considèrent qu'il existe un nombre plus élevé de types appartenant à cette espèce. SOLOWAY (11) étudiant 108 souches de streptocoques viridans isolées d'endocardites sous-aiguës et 99 souches isolées de molaires extraites, distingue au moins 8 types différents. SELBIE, SIMON et ROBINSON (9), par la méthode des précipitines à l'aide d'antigènes FULLER, ont classé un nombre important de souches, en types, considérés comme groupes. Des 96 souches étudiées, 79 ont été réparties en 5 groupes; huit souches appartenaient aux groupes Lancefield A, D, G ou B, le reste des souches ne pouvant être classifié.

Selon TOPLEY, le problème de la relation entre les soi-disant groupes de SELBIE et les types de SOLOWAY reste à être élucidé. La classification des streptocoques alpha-hémolytiques présente, en général, d'après le même auteur, de sérieuses difficultés et il n'existe pas de critères pour une sous-division satisfaisante.

Quant à la composition chimique des antigènes isolés des streptocoques viridans, les travaux de LANCEFIELD (1925/4) concluaient sur la présence, dans la constitution de ces germes, d'un complexe antigénique analogue à celui trouvé par AVERY et HEIDELBERGER chez les pneumocoques, et que certaines différences seraient dues à des particularités de la structure cellulaire.

Les très rares travaux concernant la constitution chimique des antigènes isolés des streptocoques non-hémolytiques, parus ultérieurement, paraissent

confirmer l'opinion selon laquelle les streptocoques viridans ne posséderaient pas d'antigènes polyosidiques de groupe.

Mirrick et coll. (5) ont isolé, à partir d'une espèce de streptocoque qu'ils dénomment MG, un polysaccharide qui précipite en présence d'un antisérum *Salivarius* I et qu'ils considèrent analogue au polysaccharide capsulaire du pneumocoque, du fait que, tout comme ce dernier — non-antigénique pour le lapin — il immunise l'homme par une seule inoculation intradermique. Williamson et Bresley (12) ont également réussi à immuniser des souris avec un polysaccharide de *Str. salivarius*.

Les diverses espèces de streptocoques viridans de la gorge de l'homme, bien que généralement saprophytes, peuvent être les agents responsables de diverses infections dentaires, suivies parfois d'une affection grave: l'endocardite bactérienne sous-aiguë. Parmi ces germes, l'espèce *Str. sanguis* représente l'agent principal des cas d'endocardite.

L'actualité du problème des streptocoques viridans, les difficultés de classification, ainsi que le peu de connaissances concernant leur constitution nous ont incités à entreprendre l'étude de la structure chimique et antigénique de ces germes.

A ce propos, nous avons effectué: 1. *la détermination du taux des glucides ;* 2. *l'étude chromatographique des polysaccharides*, afin d'établir une éventuelle relation entre la richesse des germes en glucides et la présence dans la constitution de ces glucides, du rhamnose (caractéristique de la spécificité des polysaccharides de la paroi cellulaire des streptocoques) et 3. des *recherches sur la possibilité d'obtenir des antigènes* satisfaisants, tant du point de vue spécificité, que du point de vue rendement, afin d'étudier la constitution chimique de ces antigènes et leur réactivité sérologique.

Les réactions d'identification sérologique étant en fonction de la qualité de l'antigène, c'est-à-dire de la méthode utilisée pour son extraction, on a employé comparativement plusieurs techniques d'extraction.

Dans le but de confirmer l'opinion de Lanc field sur l'analogie du complexe antigénique des streptocoques viridans avec celui du pneumocoque, on a utilisé, entre autres méthodes, la technique qui nous a permis, dans un travail antérieur, d'isoler des antigènes spécifiques du pneumocoque type II (2).

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

*Souches microbiennes.* Le matériel étudié comprend 49 souches de streptocoques présentant sur gélose-sang une hémolyse de type alpha ou gamma, dont 22 souches à antigènes de groupe Lancefield et 27 souches de diverses espèces de streptocoques viridans, d'après Sherman (tableaux I et II). Les premières, représentent les groupes Lancefield B, D, F, H, K. N. Les 27 souches dépourvues d'antigènes de groupe, classifiées au préalable d'après les propriétés biochimiques, appartiennent aux espèces: *Str. salivarius*, *Str. mitis*, *Str. MG*, *Str. sanguis* *Str. uberis* et *Str. thermophilus*. Toutes les souches appartenant aux espèces *Str. salivarius* et *Str. sanguis* élaboraient sur des milieux à sucrose du levan ou du dextran, respectivement identifiés par des réactions sérologiques à l'aide de sérums anti-levan, anti-dextran et anti-pneumococcique type II.

Chaque espèce est constituée d'un nombre de types sérologiques établis au cours d'un autre travail (1).

La répartition par espèces et types sérologiques de ces souches est représentée dans le tableau I.

Les souches de *Str. sanguis* figurant dans ce tableau, se groupent comme suit, du point de vue sérologique: souches à antigène groupe H (H Challis, 55128 Pasteur, 90, 91, 164, 165, 166), souches sans antigène H représentant au moins trois types, (173, 174, 178, 198, 147, 212, 161) et la souche 163 à antigènes groupe H et 173.

Les souches des espèces *Str. salivarius*, *Str. mitis*, *Str. MG* et *Str. sanguis* ont été isolées des sécrétions pharyngiennes, bronchiques, infections dentaires, etc. Notons que les souches 150a, 150b et 125 *Str. mitis*, 35 *Str. MG*, 90, 91, 198, 147 *Str. sanguis* et 183 *Str. uberis* proviennent de cas d'endocardite sous-aiguë. A l'exception de la souche 183, les autres souches de *Str. uberis*, ont été isolées d'un sérum purifié infecté et la souche 55 *Str. thermophilus* du yougourth.

*Sérums.* Les sérums précipitants de lapin ont été préparés selon la méthode décrite dans un autre travail (1).

*Les antigènes* ont toujours été isolés de germes lavés par centrifugation et acétonés.

Les quatre méthodes suivantes d'extraction ont été utilisées:

I. *Méthode d'extraction par le phénol* 90%.

Cinq grammes germes secs sont suspendus dans 100 ml phénol 90% et maintenus 24 heures à la température du laboratoire, avec agitation fréquente. Après centrifugation, le surnageant phénolique est additionné de 3 volumes d'alcool à 96° et le précipité obtenu est repris dans un petit volume d'eau et dialysé, jusqu'à la disparition du phénol. On sépare le matériel insoluble par centrifugation et on filtre par Seitz EK.

II. *Méthode d'extraction par chlorure de sodium* 0,90%, des germes antérieurement traités au phénol.

Les germes constituant le résidu de l'extraction au phénol 90% sont lavés à l'acétone jusqu'à la disparition du phénol et ensuite séchés; les germes secs sont suspendus dans une solution 0,90% de ClNa, contenant 20% méthanol et maintenus 48 heures à 37°. Le surnageant est centrifugé, dialysé et stérilisé par Seitz EK.

III. *Méthode d'extraction par solution* 2% *de désoxycholate de sodium.* Trois grammes germes acétonés sont suspendus dans 100 ml solution 2% désoxycholate de sodium et maintenus 24 heures à 37°. On obtient une masse gluante qui doit être fluidifiée par forte agitation; une centrifugation à 16—18.000 t/m est nécessaire pour séparer les germes. Le surnageant est dialysé contre de l'eau courante pendant 48 heures; on sépare par centrifugation le matériel insoluble et on dialyse pendant 24 heures contre de l'eau distillée. Le matériel est filtré par Seitz EK.

Les germes séparés par centrifugation à 18.000 t/m sont lavés à l'eau distillée, toujours par centrifugation, et serviront à une nouvelle extraction.

IV. *Méthode d'extraction par* ClH, *solution* 1%.

Les bactéries préalablement soumises à l'extraction par le désoxycholate de sodium et lavées, sont suspendues dans 100 ml solution 1% de ClH et maintenues au bain-marie à 90° pendant 40 minutes. On centrifuge et le surnageant clair ou légèrement opalescent est additionné d'acide trichloracétique (concentration finale 10%); on sépare les protéines par centrifugation ou

*Tableau I*

**Streptocoques viridans — distributions par espèces et types sérologiques**

| Classification biochimique | Réactions de précipitation avec les sérums anti : 55126 | 104 | 5625 | 150a | 140 | 195 | 125 | 5426 | 35 | H. Cl allis | 55128 | 90 | 166 | 163 | 173 | 174 | 198 | 147 | 21 | 183 | 55 | Rhamnose |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Str. salivarius* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 55126 Pasteur | D | D | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | + |
| 104 | D | $4^+$ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | + |
| 248 | — | — | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | — |
| *Str. mitis* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5625 Pasteur | | | $3^+$ | — | — | — | — | | | | | | | | | | | | | | | + |
| 150a | | | — | $2^+$ | $2^+$ | — | — | | | | | | | | | | | | | | | — |
| 150b | | | — | 2 | 2 | — | — | | | | | | | | | | | | | | | — |
| 140 | | | — | — | $3^+$ | — | — | | | | | | | | | | | | | | | — |
| 124 | | | — | — | $2^+$ | — | — | | | | | | | | | | | | | | | — |
| 195 | | | — | — | — | D | — | | | | | | | | | | | | | | | — |
| 125 | | | — | — | $2^+$ | — | D | | | | | | | | | | | | | | | — |
| 141 | | | — | — | ± | — | — | | | | | | | | | | | | | | | — |
| *Str. MG* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5426 Pasteur | | | | | | | | D | D | | | | | | | | | | | | | + |
| 35 | | | | | | | | D | $4^+$ | | | | | | | | | | | | | + |
| 201 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | + |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Str. sanguis* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| H. Challis *) | | | | | | | | | | | $3^+$ | $3^+$ | $3^+$ | $2^+$ | – | – | – | – | – | | | | | |
| 55128 Pasteur | | | | | | | | | | | D | D | D | D | – | $4^+$ | – | – | – | | | | | + |
| 90 | | | | | | | | | | | $4^+$ | D | $4^+$ | D | ± | $1^+$ | – | $1^+$ | – | | | | | + |
| 91 | | | | | | | | | | | $4^+$ | D | $4^+$ | D | $1^+$ | $1^+$ | – | $1^+$ | – | | | | | + |
| 164 | | | | | | | | | | | D | D | D | D | – | – | – | – | – | | | | | + |
| 165 | | | | | | | | | | | D | D | D | D | – | ± | – | – | – | | | | | + |
| 166 | | | | | | | | | | | D | D | D | $3^+$ | – | $2^+$ | – | – | – | | | | | + |
| 163 | | | | | | | | | | | D | D | D | D | D | $3^+$ | D | D | – | | | | | traces |
| 173 | | | | | | | | | | | – | – | – | $2^+$ | D | D | $4^+$ | – | – | | | | | – |
| 174 | | | | | | | | | | | – | – | – | $3^+$ | $4^+$ | D | D | – | – | | | | | – |
| 178 | | | | | | | | | | | – | – | – | $3^+$ | – | D | D | – | – | | | | | – |
| 198 | | | | | | | | | | | – | – | – | D | – | $2^+$ | – | $4^+$ | – | | | | | + |
| 147 | | | | | | | | | | | – | – | – | $1^+$ | – | – | – | $3^+$ | $4^+$ | | | | | – |
| 212 | | | | | | | | | | | – | – | – | – | – | ± | – | – | – | | | | | – |
| 161 | | | | | | | | | | | $1^+$ | – | $1^+$ | $1^+$ | $1^+$ | – | – | – | $2^+$ | | | | | traces |
| *Str. uberis* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 21 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | D | – | | | – |
| 19 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | D | – | | | traces |
| 183 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | – | D | | | – |
| 45 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | – | – | | | – |
| *Str. thermophilus* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 55 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | $3^+$ | | + |

*) Les souches *H. Challis, 55128, 90, 91, 164, 165, 166* appartenant au groupe *H. Lancefield*, sont inclues afin d'être comparées aux souches de *Str. sanguis*, ne réagissant pas avec les sérums groupe H *(Challis*, 55128 et 90).

*Légende:* D = précipité abondant déposé sous forme de disque non-dissociable à l'agitation;
$+++$, $++$, $+$, $\pm$ = degré de l'intensité des réactions de précipitation.

filtration et le surnageant clair est dialysé. On filtre par Seitz ou l'on précipite l'antigène par 3 volumes d'alcool à 96°.

Les germes acétonés ont servi au dosage des glucides et à la chromatographie des polysaccharides.

Les antigènes ont été analysés du point de vue contenu en azote, substances réductrices et acides nucléiques, et les polysaccharides ont été soumis à l'analyse chromatographique. On a utilisé les techniques classiques courantes: *Micro-Kjeldahl* pour *l'azote*, *Hagedorn-Jensen* pour les *glucides*, *Elson-Morgan* pour les *héxosamines* et la méthode de la précipitation cuivreuse des bases puriniques, pour les *acides nucléiques*.

Pour la chromatographie, effectuée sur papier Whatman No. 1 et 4, on a utilisé comme liquide d'irrigation le butanol — acide acétique — eau (40:10: 50) et comme révélateur, le phtalate d'aniline.

La réactivité sérologique des antigènes a été déterminée par le « Ring test » et par des précipitations en gel d'agar, selon la technique d'Ouchterlony (6).

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

*Détermination du taux des glucides et analyse chromatographique des polysaccharides.* Le dosage des glucides des 49 souches de streptocoques non-hémolytiques étudiées montre des taux variant entre 12 g% et 38 g% (tableau II). On ne constate pas de différences en ce qui concerne la teneur en glucides des souches de streptocoques non-hémolytiques à antigènes de groupe Lancefield et les souches de streptocoques viridans, proprement dites.

L'analyse chromatographique des polysaccharides n'a pas permis d'établir une relation directe entre la richesse des germes en polysaccharides et la présence du rhamnose dans la constitution de ces polysaccharides. Les polysaccharides de germes, ne contenant que 14% g de glucides, possèdent du rhamnose, tandis que les polysaccharides de souches, ayant jusqu'à 24—27% g de glucides, en sont dépourvus. Le rhamnose est toujours présent dans les polysaccharides des souches appartenant aux groupes Lancefield B, F, H, K, N, et D, analysées. (tableau II).

Mentionnons que 10 des 12 souches de streptocoques groupe D étudiées, possèdent des polysaccharides avec rhamnose, les deux autres, dépourvues de ce glucide, appartiennent à l'espèce *Str. bovis*.

Cummins et Harris (3), étudiant la composition chimique des parois cellulaires de diverses espèces microbiennes Gram positives, constatent la présence du rhamnose dans la constitution de 8 souches de streptocoques appartenant aux groupes Lancefield A, B, C, D, E, F. Ils prêtent un grand intérêt aux différences remarquées entre deux souches du groupe D, dont une contient du mannose, en plus du rhamnose et du glucose, tandis que la seconde, dépourvue de mannose, contient du glucose, du galactose et du rhamnose. Salton (8) n'a pas mis en évidence du mannose dans la même souche de streptocoque groupe D.

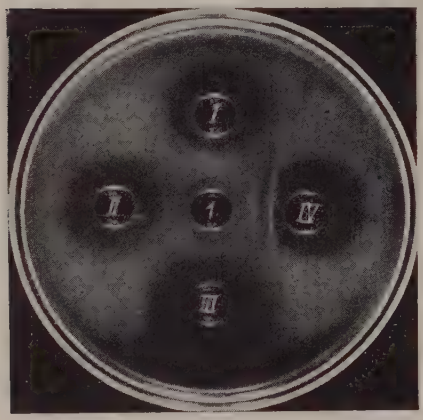
Trois des 12 souches d'entérocoques étudiées par nous, contiennent du mannose (738 *Str. liquefaciens*, 325 *Str. durans* et 184 *Str. faecalis* atypique) et deux souches sont dépourvues de galactose (142 *Str. zymogenes* et 184 *Str. faecalis* atypique).

*Tableau II*

**Teneur en substances réductrices et composition en oses des glucides de 22 souches de streptocoques non-hémolytiques à antigènes de groupe et 27 souches de streptocoques viridans**

| No. | Souche | Groupe Lancefield | Espèce | Substances réductrices (exprimées en glucose) pour 100g germes | Composition en oses des glucides | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Rhamnose | Glucose | Galactose | Hexosamines |
| 1 | B. Lewis | B | *Str. agalactiae.* | 14.00 g | + | + | — | + |
| 2 | 7 | F | | 26.00 » | + | + | — | + |
| 3 | 55128 | H | » *sanguis* . | 30.00 » | + | + | — | + |
| 4 | 90 | H | » » | 20.70 » | + | + | — | + |
| 5 | 91 | H | » » | 31.70 » | + | + | — | + |
| 6 | 164 | H | » » | 21.30 » | + | + | — | + |
| 7 | 165 | H | » » | 23.10 » | + | + | + | + |
| 8 | 166 | H | » » | 31.70 » | + | + | — | + |
| 9 | Charwoman | K | | 28.00 » | + | + | — | + |
| 10 | Kiel | N | | 22.30 » | + | + | — | + |
| 11 | F 76 | D | | 26.20 » | + | + | + | + |
| 12 | 204 | D | *Str. zymogenes* | 21.00 » | + | + | + | + |
| 13 | 142 | D | » » | 22.50 » | + | + | — | + |
| 14 | 158 | D | » » | 19.50 » | + | + | + | + |
| 15 | 616 | D | *Str. liquefaciens* | 24.00 » | + | + | + | + |
| 16 | 738 | D | » » | 23.50 » | + | + | + | + |
| 17 | 184 | D | » *faecalis atypique* | 22.00 » | + | + | — | + |
| 18 | 215 | D | » *faecium* | 19.60 » | + | + | + | + |
| 19 | 444 | D | » » | 22.00 » | + | + | + | + |
| 20 | 325 | D | » *durans* | 21.60 » | + | + | + | + |
| 21 | 423 | D | » *bovis* | 20.30 » | — | + | + | + |
| 22 | 123 | D | » *bovis* | 19.60 » | — | + | + | + |
| 23 | 55126 | | *Str. salivarius* (Pasteur) | 30.00 » | + | + | + | + |
| 24 | 104 | | » | 38—43» | + | + | + | + |
| 25 | 248 | | » | — | — | + | + | + |
| 26 | 5625 | | *Str. mitis* (Pasteur) | 35.00 » | + | + | + | + |
| 27 | 150a | | » » | 15.00 » | — | + | + | + |
| 28 | 150b | | » » | 19.00 » | — | + | + | + |
| 29 | 140 | | » » | 24.20 » | — | + | + | + |
| 30 | 124 | | » » | 19.50 » | — | + | + | + |
| 31 | 195 | | » » | 18.20 » | — | + | + | + |
| 32 | 125 | | » » | 22.80 » | — | + | + | + |
| 33 | 141 | | » » | 21.30 » | — | + | + | + |
| 34 | 5426 | | *Str. MG.* (Pasteur) | 32.00 » | + | + | + | + |
| 35 | 35 | | » » | 26.20 » | + | + | — | + |
| 36 | 201 | | » » | 22.00 » | + | + | — | + |
| 37 | 163 | | *Str. sanguis* | 15.20 » | traces | + | + | + |
| 38 | 173 | | » » | 20.00 » | — | — | — | — |
| 39 | 174 | | » » | 20.00 » | — | + | + | + |
| 40 | 178 | | » » | 16.00 » | — | + | + | + |
| 41 | 198 | | » » | 32.00 » | + | + | — | + |
| 42 | 147 | | » » | 27.30 » | — | + | + | + |
| 43 | 212 | | » » | 15.80 » | — | + | + | + |
| 44 | 161 | | » » | 16.20 » | traces | + | + | + |
| 45 | 21 | | *Str. uberis* | 15.40 » | — | + | + | + |
| 46 | 19 | | » » | — » | traces | + | + | + |
| 47 | 183 | | » » | 19.00 » | — | + | + | + |
| 48 | 45 | | » » | 12.00 » | — | + | + | + |
| 49 | 55 | | *Str. thermophilus* | 22.00 » | + | + | + | + |

Le glucose et les héxosamines entrent dans la constitution des polysaccharides de toutes les souches groupe D étudiées.




*Photographie* 1. — Réaction de diffusion en gel entre l'antigène Str. 163 et différents sérums anti-viridans. La réaction est spécifique de type; l'antigène ne précipite qu'en présence du sérum homologue.

1. antigène 163; I — antisérum 35; II — antisérum 195; III. — antisérum polyvalent anti-viridans; IV — antisérum 163.

Les 27 souches appartenant aux diverses espèces et types de streptocoques viridans se divisent en deux catégories, en ce qui concerne la présence du rhamnose: souches dont les polysaccharides contiennent ce glucide et souches sans rhamnose. Le rhamnose est présent dans: 2 souches *Str. salivarius*, 1 *Str. mitis*, 3 *Str. MG* et 6 souches de *Str. sanguis* possédant l'antigène groupe H de Lancefield. Le rhamnose n'entre pas dans la composition des polysaccharides isolés de: 1 souche *Str. salivarius*, 7 souches *Str. mitis*, 6 *Str. sanguis* et 3 *Str. uberis*.

Les polysaccharides de toutes ces souches contiennent des héxosamines et du glucose; lorsque le rhamnose est absent, on observe la présence constante du galactose à côté du glucose.

L'absence du rhamnose dans la constitution des polysaccharides des souches de streptocoques viridans, n'a pas influencé la spécificité sérologique des antigènes isolés de ces souches.

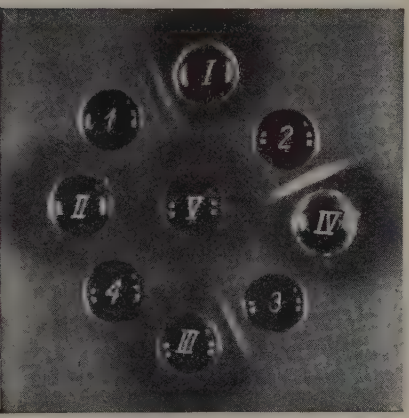
I. *Méthode d'extraction par le phénol* 90%. A l'aide du phénol 90%, on a séparé des antigènes spécifiques à partir de 30 souches. Cette méthode a permis la séparation des polysaccharides de 5 souches (90, 91, 166 *Str. sanguis* groupe H et 173, 161 *Str. sanguis*); toutes les autres souches ont libéré des mucoprotéines. Les quantités de polysaccharides obtenues ont été minimes (0,30 g% 0,80 g%), et le rendement en mucoprotéines généralement réduit. C'est pourquoi une étude chimique et sérologique de ces antigènes n'a pas été possible.

Les mucoprotéines isolées de toutes les souches contenaient 9—11 g% azote, le taux des substances réductrices, exprimé en glucose, variant entre 16—18 g%.

II. *Extraction par le CINa* 0,90% Les antigènes isolés, à l'aide du CINa 0,90%, des germes traités au préalable par le phénol, étaient constitués de nucléoprotéines (dosage du phosphore et de l'azote, précipitation cuivreuse des bases puriniques). Très différentes du point de vue rendement, les nucléoprotéines ont été isolées dans des proportions variant de 1 à 6 g%. Parfois, les nucléoprotéines étaient impurifiées par d'importantes quantités de polysaccharides (souches 55126, 104, 5623, 91).

Les nucléoprotéines donnent des réactions de précipitation intenses en présence d'immuno-sérums spécifiques. Quatre sérums anti-viridans de chevaux immunisés avec des souches de streptocoques viridans, ont précipité intensément (ring-test) seulement avec les nucleoprotéines provenant des souches

*Photographies 2a* et *2b* — Réactions de précipitation en gel démontrant la spécificité de type des antigènes.




*2a* — antigène 163 (1) et sérum homologue 163 (I); antigène 201 (2) et sérum homologue 201 (IV); antigène 198 (3) et sérum homologue 198 (III); le sérum 35 (II) étant faible n'a donné avec l'antigène homologue (4) qu'une légère ligne de précipitation invisible sur la photographie. L'antisérum polyvalent anti-viridans de cheval (V) ne donne pas de précipitation avec les antigènes qui n'entrent pas dans la composition du vaccin utilisé à l'immunisation.

*2b* — antigène 163 (1) et sérum homologue 163 (IV); antigène 195 (2) et sérum homologue 195 (I); antigène 55 (3) et sérum homologue 55 (II); antisérum polyvalent anti-viridans (III).

utilisées pour l'immunisation des chevaux. On a de même obtenu en gel d'agar, 1—2 bandes de précipitation entre les nucléoprotéines et les sérums homologues de lapin, prouvant ainsi une stricte spécificité de type.

Des réactions de précipitation en gel d'agar ont été obtenues par Otto (7) avec des suspensions de streptocoques en solution physiologique et les antisérums groupes Lancefield.

Le rendement insuffisant des antigènes obtenus par le phénol, d'une part, et les trop grandes différences entre les diverses souches, dans le rendement des antigènes extraits par le ClNa 0,90% d'autre part, nous ont forcés, malgré l'efficience qualitative de ces antigènes, de recourir à d'autres méthodes d'extraction, en vue d'obtenir un antigène plus homogène et d'un rendement qui nous permette une étude plus complète de la constitution chimique et du comportement sérologique.

L'objectif principal était d'obtenir des informations sur la structure chimique des antigènes des diverses souches de streptocoques viridans étudiées.

III. *Extraction par le désoxycholate de sodium.* Les extraits obtenus à l'aide d'une solution 2% de désoxycholate de sodium, ainsi que ceux isolés ultérieurement par le ClH 1%, paraissent satisfaire le but proposé.

A partir de 13 souches différentes, on a isolé, avec des rendements variant de 6—12 g%, des complexes antigéniques, contenant 8—11 g% d'azote et 12—35 g% substances réductrices (exprimées en glucose) (tableau III).

*Photographie* 3. — Réactions spécifiques de type. Les antisérums 195 (I), 198 (II) et 201 (III) réagissent avec les antigènes homologues 195 (1), 198 (2) et 201 (3). Dans les réservoirs inférieurs, les antigènes mis en réaction sont hétérologues. L'antigène 201 se dirige vers le sérum homologue 201.

Les antigènes donnent des réactions de Dische intensément positives qui (corroborées avec les dosages des bases puriniques) révèlent la présence d'importantes quantités d'acide désoxyribonucléique, dans la majorité des souches étudiées.

Ces antigènes réagissent par de fortes précipitations en gel d'agar seulement avec les antisérums homologues ou hétérologues du même type sérologique à l'exception des antigènes isolés des souches groupe D, 204,76 et 158, qui précipitent avec plusieurs anti-sérums groupe D.

Les photographies No. 1, 2a et 2b et 3 montrent que les antigènes obtenus des divers types de streptocoques viridans, représentant les espèces *Str. mitis* 195, *Str. MG* 35, et 201, *Str. sanguis* 163 et 198 et *Str. thermophilus* 55 sont strictement spécifiques de type.

Les extraits obtenus des mêmes souches, à l'aide du HCl 1%, avec un rendement de 5,0—6,0 g%, sont constitués de polysaccharides.

L'étude des antigènes obtenus par le désoxycholate de sodium et par le traitement ultérieur à l'acide chlorhydrique, fait l'objet de la note suivante.

*Tableau III*

| Souches de streptocoques | Rendement des antigènes isolés par le désoxycholate de Na 2% et leur composition | | | Rendement des polysaccharides extraits ultérieurement par HCl 1% |
|---|---|---|---|---|
| | Antigène | Azote | Subst. réd. glucose | |
| | Pour 100 g germes | Pour 100 g antigènes | | Pour 100 g germes secs |
| F76 groupe D | 5,50 g | 8,50 g | 12,0 g | — |
| 204 » D | 9,0 » | 9,0 » | 12,0 » | 5,50 » |
| 158 » D | 6,40 » | 9,30 » | 11,50 » | 6,30 » |
| 7 » F | 7,50 » | 8,00 » | 35,0 » | 6,20 » |
| 163 *Str. sanguis* | 11,10 » | 9,40 » | 16,0 » | 6,0 » |
| 198 » » | 6,60 » | 10,0 » | 17,0 » | 5,20 » |
| 212 » » | 7,80 » | 10,70 » | 17,0 » | 5,50 » |
| 55126 *Str. salivarius* | 9,20 » | 10,0 » | 18,0 » | 5,0 » |
| 104 » » | 7,70 » | 7,30 » | 31,0 » | 6,40 » |
| 195 *Str. mitis* | 9,70 » | 11,20 » | 20,0 » | 5,10 » |
| 35 » *MG* | 5,0 » | 9,0 » | 18,0 » | 6,80 » |
| 201 » » | 5,0 » | 10,90 » | 18,0 » | 6,30 » |
| 55 *Str. thermophilus* | 5,60 » | 10,30 » | 17,0 » | — |

## CONCLUSION

On a établi la richesse en polysaccharides et les relations entre la quantité des polysaccharides et la présence du rhamnose dans la constitution de ces polysaccharides de 49 souches de streptocoques non-hémolytiques et viridans, dont 22 souches appartenant à différents groupes Lancefield et 27 souches sans antigènes de groupe. On n'a pas constaté de différences entre les streptocoques non-hémolytiques à antigènes de groupe et les streptocoques viridans proprement dits, en ce qui concerne leur teneur en polysaccharides, ni une relation entre le taux des glucides et la présence du rhamnose.

Le rhamnose est présent dans les polysaccharides des streptocoques des groupes Lancefield B, D, F, H, K et N et de 14 souches appartenant aux espèces *Str. salivarius*, *Str. mitis*, *Str. MG*, *Str. sanguis* à antigène groupe H, et *Str. termophilus*.

Les polysaccharides isolés du reste des souches, représentant des types sérologiques distincts dans le cadre des espèces mentionnées, ainsi que de 4 souches de *Str. uberis* et 2 souches de *Str. bovis* groupe D, ne contiennent pas du rhamnose.

Plusieurs méthodes ont été utilisées afin d'isoler des antigènes spécifiques à rendement satisfaisant.

Le désoxycholate de sodium à 2% a permis d'obtenir un complexe antigénique très spécifique et la séparation consécutive, des mêmes germes, d'un polysaccharide.

## BIBLIOGRAPHIE


1. Baldovin-Agapi C., et Beloiu I. et Caffé I. — (sous presse)
2. Barber C., Baldovin-Agapi C. Beloiu I. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie, 1959, **18**, 287.
3. Cummins C. S. et Harris A. — J. Gen. Microbiol., 1956, **14**, 583.
4. Lancefield R. C. — J. Exp. Med., 1925, **42**, 377 et 397.
5. Mirrik G., Lewis Th., Curnen Ed. et Horsfall Fr. — J. Exp. Med., 1944, **80**, 391.
6. Ouchterlony O. — Acta Path. Microbiol. Scand., 1953, **32**, 231.
7. Otto R. — Zbl. f. Bakt. Orig., 1960, **177**, 546.
8. Salton M. R. — Biochim., Biophys. Acta, 1953, **10**, 512.
9. Selbie F. R., Simon R. D. et Robinson R. — Brit. Med. J., 1949, **1**, 667.
10. Sherman J. M., Niven C. F. et Smiley K. L. — J. Bact., 1943, **45**, 249.
11. Soloway M. — J. exp. Med., 1942, **76**, 109.
12. Williamson C. et Bresley E. D. — Bact. Proceed., 1958, **64**, 76.


## К ИЗУЧЕНИЮ АНТИГЕНОВ НЕГЕМОЛИТИЧЕСКИХ СТРЕПТОКОККОВ (VIRIDANS)

### I. МЕТОДИКА ЭСТРАГИРОВАНИЯ АНТИГЕНОВ И ПОЛИСАХАРИДОВ СООБЩЕНИЕ I-ое

### КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ


Анализировали содержание полисахарида у 49 штаммов негемолитических стрептококков (среди которых 22 штамма принадлежащих к разным группам по Лэнсфильд и 27 штаммов не обладающих групповыми антигенами) и отношение между количеством полисахарида и наличием рамнозы в составе данных полисахаридов; не существует никакого отношения между количеством углеводов и наличием рамнозы.

Установлено наличие рамнозы во всех 22 штаммах, принадлежащих к группам B, F, H, K, D и N по Лэнсфильд, также как и в 14 штаммах, принадлежащих к видам

*Str. salivarius*, *Str. mitis*, *Str. MG.*, *Str. Sanguis* с группавым антигеном н и *Str. thermophilus*. Рамноза отсутствует у штаммов принадлежащих к виду *Str. uberis* и у штаммов происходящих из 7 различных типов, также как и у двух штаммов стрептококка *Bovis* (D-группы).

Испытывались несколько методов выделения специфических антигенов, обеспечивающих удовлетворительный выход.

При помощи 2%-ного дезоксихолата натрия удалось выделить очень специфический комплексный антиген и последовательно отделить из тех-же микробов полисахарид.

## BEITRÄGE ZUM STUDIUM DER ANTIGENE DER NICHT-HÄMOLYTISCHEN STREPTOKOKKEN (VIRIDANS).

### 1. METHODEN ZUR EXTRACTION DER ANTIGENE UND POLYSACCHARIDE

ZUSAMMENFASSUNG

Der Polysaccharidgehalt und die Beziehung zwischen der Polysaccharidmenge und der Anwesenheit der Rhamnose in der Zusammensetzung dieser Polysaccharide wurde bei 49 nicht-hämolytischen Streptokokkenstämmen untersucht. Davon gehörten 22 zu verschiedenen Lancefield-Gruppen, während 27 keine Gruppenantigene aufwiesen. Zwischen der Polysaccharidmenge und der Anwesenheit der Rhamnose besteht keinerlei Zusammenhang.

Es wurde festgestellt, dass die Rhamnose bei den 22 zu den Lancefield-Gruppen B,F, H,K,D, und N gehörenden sowie bei 14 Stämmen der Arten *Str. salivarius*, *Str. mitis*. *Str. MG*, *Str. Sanguis*, der H. Gruppenantigen enthält und *Str. thermophilus* und einem selbstständigen Typus vorhanden ist. Sie fehlt bei den Stämmen der Art *Str. uberis* und bei den Stämmen von 7 selbständigen serologischen Typen sowie bei 2 Stämmen von *Str. bovis* (Gruppe D).

Es wurden mehrere Verfahren zur Isolierung der spezifischen Antigene angewendet.

Mit Hilfe einer 2-prozentigen Natriumdesoxycholatlösung gelang es, ein hochspezifisches komplexes Antigen zu isolieren und anschliessend aus denselben Keimen ein Polysaccharid abzutrennen.

## CONTRIBUTIONS TO THE ANTIGENIC STUDY OF NON-HAEMOLYTIC (VIRIDANS) STREPTOCOCCI

### 1. METHODS APPLIED FOR THE EXTRACTION OF ANTIGENS AND POLYSACCHARIDES

SUMMARY

The polysaccharide contents as well as the relationship between the amount of polysaccharide and the presence of rhamnose in the structure of these polysaccharides have been investigated in 49 strains of non-hemolytic streptococci, 22 of which belonged to various Lancefield groups while 27 contained no group antigens. There is no relationship between the amount of sugar and the presence of rhamnose.

Rhamnose was found to exist in the 22 strains belonging to Lancefield groups B,F,H,K,D, and N as well as in 14 strains belonging tot he species *Str. salivarius*, *Str. mitis*, *Str. MG*, *Str. sanguis* with group H antigen and *Str. thermophilus*. Rhamnose was absent in the strains of the species *Str. uberis*, in those belonging to 7 distinct serological types, and in 2 strains of *Str. bovis* (Group D).

Various methods were applied for the isolation of the specific antigen.

By means of a 2 per cent solution of sodium desoxycholate a highly specific complex antigen could be isolated and a polysaccharide could subsequently be separated from these germs

# CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE LA STRUCTURE ANTIGÉNIQUE DES STREPTOCOQUES NON-HÉMOLYTIQUES (VIRIDANS)

## II. FRACTIONNEMENT DES ANTIGÈNES ISOLÉS DE STREPTOCOQUES NON-HÉMOLYTIQUES

par

CELLA BARBER, CORALIA BALDOVIN-AGAPI et IRINA BELOIU

*(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Services de Biochimie générale et des Cocci pathogènes)*

— Manuscrit reçu le 23 juin 1960 —

Dans une précédente note, nous avons montré qu'en soumettant différentes souches de streptocoques non-hémolytiques à l'extraction par une solution 2% de désoxycholate de sodium, nous avons isolé des antigènes qui précipitent fortement en gel d'agar avec des sérums immuns. A partir des mêmes germes on séparait ultérieurement, en quantités importantes, des polysaccharides sérologiquement actifs (1).

La qualité de ces antigènes et les rendements importants qu'on peut obtenir de souches très différentes nous ont incités d'entreprendre leur étude dans le but d'établir — si possible — le rôle détenu par ces componentes dans la classification de ces germes.

Dans la présente note, nous rapportons sur les résultats obtenus par l'analyse des antigènes isolés à partir de 5 souches différentes et sur les relations de ces antigènes avec les antisérums homologues de lapins.

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le matériel pour l'extraction des antigènes a été constitué — comme dans le précédent travail — par les germes lavés par centrifugation et acetonés.

Les souches analysées sont les suivantes: le streptocoque 7 (groupe F), les streptocoques 104 et 55126 *Str. salivarius*, le streptocoque 198 *Str. sanguis* (type distinct) sans antigène de groupe et le streptocoque 204 (groupe D). Un streptocoque de groupe A *(Dochez* NY5) a été analysé comparativement.

Les antigènes isolés de ces souches à l'aide du désoxycholate de sodium en solution 2%, selon la technique décrite antérieurement (1), ont été fractionnés. Par addition d'acide chlorhydrique dilué, à pH 3,5, les complexes antigéniques se séparent en deux fractions dont une précipite abondamment et l'autre, qui reste dans le surnageant, représente 15—25 g% de l'antigène total.

La substance précipitée est purifiée par reprécipitation, à pH 3,5, d'une solution neutre; les deux fractions sont dialysées et stérilisées par Seitz EK.

Le polysaccharide isolé des mêmes germes, par ClH 1% (après la séparation du complexe extrait par le désoxycholate de sodium) après dialyse, est soumis aux mêmes analyses que le complexe et les fractions antigéniques qui le constituent.

Les analyses chimiques des antigènes ont été effectuées selon les techniques classiques courantes; dans la chromatographie executée sur papier Whatman Nos. 1 et 4 on a utilisé comme liquide d'irrigation le butanol-acide acétique-eau (40:10:50) et comme révélateur le phtalate d'aniline.

Les réactions de précipitation en gel d'agar ont été effectuées selon la technique d'Ouchterlony. Les tests d'absorbtion des sérums ont été conduits d'après le modèle de Heidelberger.

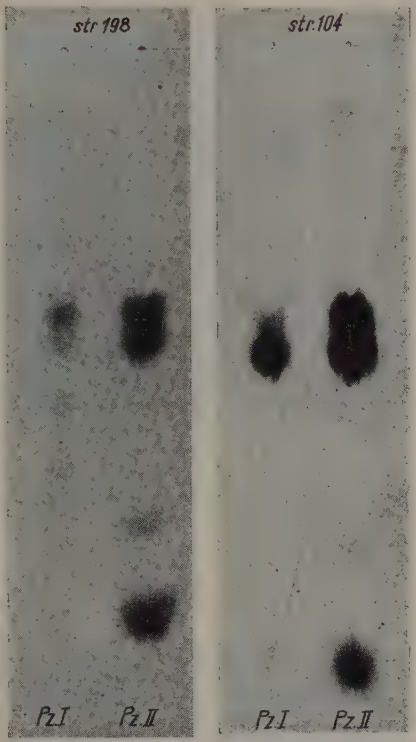
## RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'analyse des antigènes isolés de 5 souches différentes de streptocoques non-hémolytiques (et d'une souche de streptocoque de groupe A à titre de comparaison) a fourni les résultats suivants: les complexes antigéniques obtenus par l'extraction au désoxycholate de sodium des streptocoques: 7 (groupe F), 104 et 55126 *Str. salivarius* et 198 *Str. sanguis*, fractionnés par précipitation à pH 3,5

*Tableau I*

| Streptocoques | Composition des polysaccharides (I) séparés de l'extrait obtenu avec la solution 2% désoxycholate de Na Pour 100 g antigène | | Oses | Composition des polysaccharides (II) séparés avec ClH 1% Pour 100g antigène. | | Oses |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | *Azote* en g | *Substances réductrices en g* (exprimées en glucose) | | *Azote* en g | *Substances réductrices en g* (exprimées en glucose) | |
| *Str.* 7 (groupe F) | 3,5 | 60 | galactose, glucose | 1,60 | 77 | galactose, glucose, rhamnose |
| *Str. salivarius* 104 | 2,6 | 70 | galactose, glucose | 1,65 | 84 | galactose, glucose, xylose, rhamnose |
| *Str. salivarius* 55126 | 4,0 | 73 | glucose | 2,50 | 83 | galactose, glucose, xylose, rhamnose |
| *Str. sanguis* 198 (type distinct) | 3,2 | 70 | galactose, glucose, mannose, xylose | 1,85 | 76 | galactose, glucose, xylose, rhamnose |
| *Str. zymogenes* 204 (groupe D) | — | — | absentes | 0,85 | 95 | galactose, glucose, xylose, ribose, rhamnose |

à l'aide d'acide chlorhydrique dilué, se séparent en antigènes qualitativement différents, aussi bien du point de vue constitution chimique que du point de vue sérologique. Dans les surnageants de la précipitation on a obtenu des polysaccharides (Pz I) très actifs sérologiquement, précipitant fortement en gel d'agar (à des concentrations de 0,5 mg/1 ml) avec les sérums immuns homologues; les nucléoprotéines qui constituent le précipité ont la même spécificité de type, pour les souches analysées. Les polysaccharides (Pz I) séparés du complexe diffèrent qualitativement (chromatographie et sérologie) des polysaccharides (Pz II) isolés à l'aide du ClH 1% du même lot de germes; leur rendement est peu élevé (2 g%); ils ne contiennent pas du rhamnose et diffèrent d'une souche à l'autre (voir tableau I, chromatographie — photo 1 — et les précipitations en gel d'agar-photos 2—5). Leur vitesse de diffusion en gel d'agar, diffère de celle des nucléoprotéines dont ils ont été séparés et diffère également de celle des polysaccharides isolés par le ClH (Pz II). Ces derniers, d'un rendement plus important (5—6 g%) contiennent du rhamnose dans leur constitution et sont probablement les polysaccharides des parois cellulaires.

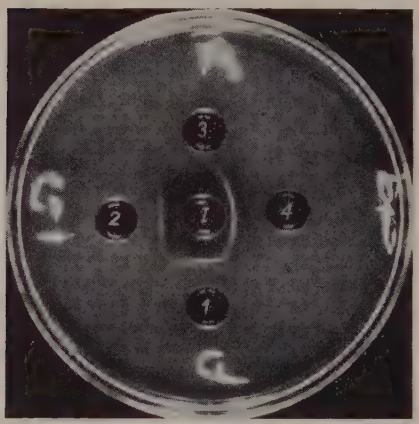



*Photographie 1 (a* et *b)*. Chromatogrammes des polysaccharides I et II isolés des streptocoques 198 *Str. sanguis* (type distinct) et 104 *Str. salivarius*.

*a:* str. 198 Pz I: galactose, glucose, mannose, xylose, traces de ribose; Pz II (ClH): galactose, glucose, ribose, rhamnose: *b:* str. 104 Pz I: galactose, glucose; Pz II: galactose, glucose, traces de ribose, rhamnose.

Le comportement de ces polysaccharides dans le test de diffusion en gel, diffère sensiblement d'une souche à l'autre: alors que les polysaccharides isolés à l'aide du ClH (Pz II) des souches 7 (groupe F) et 198 *Str. sanguis* ont une vitesse de diffusion beaucoup plus grande que les polysaccharides (Pz I) séparés des complexes au désoxycholate de sodium de ces mêmes souches, le polysaccharide (Pz II) isolé de la souche 104 par le ClH possède une vitesse de diffusion en gel, beaucoup plus petite que le polysaccharide (I) séparé du complexe au désoxycholate de sodium, de cette même souche. Par conséquent, cette différence dans les vitesses de diffusion en gel d'agar des polysaccharides ne peut être attribuée à une éventuelle dépolymérisation due à la méthode d'extraction par l'acide chlorhydrique.

Le Pz II isolé à l'aide de l'acide chlorhydrique de la souche 55126 *Str. salivarius*, ayant la même composition chimique que le polysaccharide II isolé par




*Photographie* 2) Réactions de précipitation en gel entre l'antisérum streptocoque groupe F et différentes fractions antigéniques isolées de cette souche.
I. — Sérum antistreptocoque 7 (groupe F)
1. — complexe; 2. — surnageant du complexe (Pz. I); 3. — précipité du complexe; 4. — polysacch. II (ClH).

*Photographie 3*) Réactions de précipitation en gel entre des antigènes isolés de la souche 104 *(Str. salivarius)* et le sérum homologue.
I. — Sérum anti 104 *Str. salivarius*
1. — complexe; 2. — surnageant du complexe (Pz. I); 3. — précipité du complexe; 4. — polysacch. II (ClH).

*Photographie* 4) Réactions de précipitation en gel entre l'antisérum 204 entérocoque (groupe D) et différentes fractions antigéniques isolées de la souche 204.
I. — Sérum anti 204 (groupe D) 1. — complexe; 2. — surnageant du complexe; 3. — polysacch. (ClH); 4. — précipité du complexe.

*Photographie* 5) Réactions de précipitation en gel entre un antisérum de groupe A et des antigènes isolés de deux souches (NY5 et Richards) de streptocoques hémolytiques, par différentes méthodes.
I. — Antisérum groupe A. 1. — antigène désox; 2. — subst. C (de la souche NY5); 3. — antigène phénol; 4. — subst. C (de la souche Richards)

la même méthode de la souche 104 *Str. salivarius* ne précipite pas en gel, ni avec l'antisérum 55126 *Str. salivarius* homologue, ni avec l'antisérum *Str. salivarius* 104; le polysaccharide II isolé de la souche 104 *Str. salivarius* précipite en gel seulement avec l'antisérum homologue (toutefois le « Ring-test » est positif aussi avec l'antisérum 55126). Cependant, les polysaccharides I séparés des complexes 104 et 55126 (tout comme les nucléoprotéines) donnent des précipitations croisées en gel d'agar tout aussi bien dans le cas de l'antisérum 104 *Str. salivarius* que dans celui de l'antisérum 55126 *Str. salivarius*.

Généralement, les polysaccharides II isolés par le ClH 1%, probablement des parois cellulaires, sont pauvres en azote (1,5—2.5 g%) alors que les polysaccharides séparés des complexes contiennent 3—4 g% d'azote.

En ce qui concerne la souche 204 de groupe D étudiée dans les mêmes conditions, la précipitation à pH 3,5 du complexe extrait à l'aide du désoxycholate de sodium, a fourni 2 fractions qui, après purification, ont des vitesses de diffusion en gel d'agar différentes et réagissent avec plusieurs autres sérums du groupe D à la différence des autres souches de streptocoques non-hémolytiques étudiés (7, 104, 55126 et 198); aucune de ces fractions ne contient du polysaccharide en quantités appréciables.

Elliot (2) a isolé à partir de 4 souches d'entérocoques 2 polysaccharides différents, dont un spécifique de groupe et l'autre spécifique de type. L'antigène de groupe que nous avons isolé est constitué de nucléoprotéines. Le seul polysaccharide que nous avons pu séparer de la souche 204 groupe D est celui obtenu à l'aide du ClH 1% à 90°. Le polysaccharide est pratiquement dépourvu d'azote; à l'hydrolyse acide il fournit 90% substances réductrices (exprimées en glucose) et contient: du glucose, du galactose, du xylose, du rhamnose et des hexosamines. Ce polysaccharide a une grande vitesse de diffusion en gel d'agar et ne précipite qu'avec l'antisérum homologue. L'étude d'un plus grand nombre d'entérocoques fait l'objet de recherches en cours.

La différence de comportement des divers streptocoques vis-à-vis des mêmes méthodes d'extraction pourrait nous donner des indications, soit sur la composition chimique et antigénique différente des germes, soit sur l'architecture qui différencie certaines espèces de streptocoques. C'est pourquoi un streptocoque hémolytique du groupe A a aussi été soumis à nos méthodes d'investigation. Les antigènes isolés par les mêmes techniques du streptocoque *Dochez* NY5, se comportent différemment des antigènes isolés à partir des streptocoques non-hémolytiques, par rapport au sérum immun homologue. Les fractions séparées par précipitation acide du complexe au désoxycholate de sodium, tout aussi bien que l'antigène isolé à l'aide du ClH 1% de la souche *Dochez* NY5 donnent une bande de précipitation en gel d'agar qui montre l'homogénéité des antigènes. Ces observations sont en accord avec les opinions récentes, selon lesquelles les antigènes isolés des streptocoques du groupe A, par des méthodes différentes, sont des complexes de substance C et de protéine M (7, 8, 9, 10). D'ailleurs, l'antisérum de groupe A, saturé par l'antigène obtenu à l'aide du ClH 1%, ne précipite plus avec l'antigène isolé par le désoxycholate de sodium.

Ces premières indications sur les différences de comportement des diverses espèces de streptocoques à l'action des mêmes méthodes d'extraction nous incitent à continuer nos recherches.

Des essais préliminaires nous ont montré que le complexe antigénique isolé à l'aide du désoxycholate de sodium est un bon sensibilisant des hématies formolées et tannées de mouton; les anticorps hémagglutinants peuvent être mis en évidence à l'aide de cet antigène, aussi bien dans des sérums à titre élevé que dans des sérums faibles, à la différence de l'antigène hémosensibilisant de HOLMES (3) qui a réussi à prouver la présence des anticorps seulement dans les sérums qui ne sont pas assez puissants pour réagir au « Ring test ».

La fraction antigénique, sensibilisant les hématies, est celle contenue dans le précipité obtenu à pH 3,5, c'est-à-dire la nucléoprotéine.

Ni le polysaccharide I séparé de l'extrait au désoxycholate ni le polysaccharide II isolé à l'aide du CIH n'ont sensibilisé les hématies formolées et tannées, confirmant ainsi les opinions de certains auteurs selon lesquels la substance C des streptocoques n'est pas adsorbable sur les érythrocytes (5, 6, 11). Dans quelle mesure notre antigène adsorbé sur hématies pourra aider à établir les relations existantes entre les différentes espèces de streptocoques reste à être élucidé par les recherches en cours.

## CONCLUSIONS

Les antigènes obtenus à l'aide d'une solution de désoxycholate de sodium, à partir de différentes souches de streptocoques non-hémolytiques, ont été fractionnés par précipitation à pH 3,5, avec du CIH dilué.

Le fractionnement acide a permis la séparation à partir des antigènes isolés des souches 7 (groupe F), 104 et 55126 *Str. salivarius* et 198 *Str. sanguis* type distinct, de polysaccharides et de nucléoprotéines spécifiques, qui précipitent fortement en gel d'agar seulement avec les sérums immuns homologues. Toutes ces fractions ont des vitesses de diffusion en gel très différentes.

A partir des mêmes souches, on a isolé, après la séparation de l'antigène extrait par le désoxycholate de sodium, des polysaccharides qualitativement différents de ceux contenus dans le complexe, possédant du rhamnose dans leur constitution et correspondant, probablement, aux polysaccharides des parois cellulaires.

L'antigène obtenu par l'extraction au désoxycholate de sodium de la souche 204 groupe D, précipité à pH 3,5 par du CIH dilué, a fourni deux fractions protéiniques qui ont des vitesses de diffusion différentes en gel d'agar; de cette souche on a séparé un seul polysaccharide, à l'aide du CIH 1%, après l'extraction de l'antigène au désoxycholate. Le polysaccharide est constitué de glucose, galactose, xylose, rhamnose et hexosamines; il est spécifique de type et correspond au polysaccharide des parois cellulaires. La spécificité de l'antigène isolé par le désoxycholate de sodium, de la souche 204 groupe D n'est pas limitée au sérum homologue, comme chez les autres souches de streptocoques étudiées.

## BIBLIOGRAPHIE

1. BARBER C., BALDOVIN-AGAPI C., BELOIU I. et CAFFÉ I. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie, 1961, **20**, 219
2. ELIOTT S. D. — J. Exp. Med., 1960, **111**, 621.
3. HOLMES M. — Australian J. Exp. Biol. and Med., 1958, **36**, 395.
4. OUCHTERLONY O. — Acta Path. et Microbiol. Scand., 1953, **32**, 231.
5. PIERCE W. — J. Bact., 1959, **77**, 726.

6. Pakula R. et Walczak W. — Acta Microbiol. Polon., 1955, **4**, 235.
7. Schmidt W. — J. Immunol., 1957, **78**, 179.
8. Schmidt W. — J. Exp. Med., 1952, **95**, 105.
9. Schwab J., Cromartie W. et Robinson B. — J. Exp. Med., 1959, **109**, 43
10. Slade H. et Netter J. — J. Bact., 1956, **71**, 236.
11. Zablocki B., Kotelkok, Gosciki J. et Szykier L. — Bull. de l'Acad. Pol. Sci., 1956, **4**, 167.

## К ИЗУЧЕНИЮ АНТИГЕНОВ НЕГЕМОЛИТИЧЕСКИХ СТРЕПТОКОККОВ (VIRIDANS)

### II. ДРОБЛЕНИЕ АНТИГЕНОВ ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ НЕГЕМОЛИТИЧЕСКИХ СТРЕПТОКОККОВ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Экстракты полученные при помощи 2%-ного раствора дезоксихолата натрия из разных стрептококков фракционировались путем осаждения соляной кислотой при pH 3,5. Кислое дробление дало возможность выделить из штаммов стрептококка (группы F) 104 и 55126 типа Salivarius также как и из особого типа стрептококка 198, полисахарид и специфические нуклеопротеины, выражено осаждающиеся в агаровом геле, только с гомологической сывороткой. Эти фракции движутся в геле с разными скоростями. Из тех-же штаммов, после отделения антигена экстрагированного при помощи дезоксихолата, выделены полисахариды отличающиеся качественно от полисахарида, выделенного из комплекса; данные полисахариды содержат рамнозу в их составе и повидимому соответствуют полисахаридам клеточной стены.

Экстракт полученный при помощи раствора дезоксихолата из штамма энтерококка 204 (Группа D) осажденного соляной кислотой при pH 3,5, разделяется в 2 белковые фракции, диффундирующие в геле с разными скоростями; из данного штамма после отделения первого антигена, выделен только один полисахарид при помощи 1%-ной соляной кислоты. Данный полисахарид диффундирует очень быстро в агаровом геле; состоит он из глюкозы, галактозы, ксилозы и рамнозы, соответствует полисахариду клеточной стены и обладает типовой специфичностью.

Специфичность антигенов выделенных из 204-го штамма энтерококка не ограпо отношению ничена к гомологичной сыворотке, так как это бывает у остальных стрептококков.

## BEITRÄGE ZUM STUDIUM DER ANTIGENE DER NICHT-HÄMOLYTISCHEN STREPTOKOKKEN (VIRIDANS).

### II. DIE AUFSPALTUNG DER AUS NICHT-HÄMOLYTISCHEN STREPTOKOKKEN ISOLIERTEN ANTIGENE

ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe einer 2-prozentigen Natriumdesoxycholatlösung gewonnene Extrakte aus verschiedenen Streptokokken wurden durch Fällung mit HCl bei pH 3,5 weiter aufgespaltet. Die Säurefraktionierung gestattete es, aus den Streptokokkenstämmen 7 (Gruppe F), 104 und 55126 *(Str. salivarius)* und 198 (selbstständiger Typus) ein spezifisches Polysaccharid und spezifische Nukleoproteine abzutrennen, die in Agargel nur mit homologen Sera eine ausgeprägte Präzipitation aufwiesen. Die Wanderungsgeschwindigkeit dieser Fraktionen in Gel ist verschieden. Nach Abtrennung des mit Desoxycholat extrahierten Antigens, wurden aus denselben Stämmen Polysaccharide isoliert, die sich von den aus dem Komplex abgespalteten qualitativ unterscheiden, Rhamnose enthalten und wahrscheinlich den Polysacchariden der Zellwand entsprechen.

Der aus dem Enterokokkenstamm 204 (Gruppe D) mit Hilfe von Desoxycholatlösung gewonnene und durch HCl bei pH 3,5 gefällte Extrakt enthält 2 Eiweissfraktionen, die in Gel mit verschiedenen Geschwindigkeiten wandern. Nach Abtrennung des ersten Antigens, wurde aus diesem Stamm mit Hilfe von 1 prozentiger HCl ein einziges Polysaccharid isoliert. Dieses Polysaccharid wandert sehr rasch in Agargel, besteht aus Glukose, Galaktose, Xylose, Rhamnose und Hexosamines, entspricht dem Polysaccharid der Zellwand und ist typenspezifisch.

Die Spezifizität der aus dem Enterokokkenstamm 204 isolierten Antigene ist nicht wie bei beiden anderen untersuchten Streptokokken auf das homologe Serum beschränkt.

## CONTRIBUTIONS TO THE ANTIGENIC STUDY OF NON-HAEMOLYTIC (VIRIDANS) STREPTOCOCCI

### II. FRACTIONATION OF ANTIGENS ISOLATED FROM NON-HAEMOLYTIC STREPTOCOCCI

SUMMARY

The extracts obtained from various streptococci by means of a 2 per cent sodium desoxycholate solution have been fractionized by precipitation with HCl at pH 3.5. Acid fractionation resulted in the isolation of a polysaccharide and of specific nucleoproteins from the strains of streptococcus 7 (group F), *Str. salivarius* 104 and 55 126, and streptococcus 198 (distinct type). In agar gel, the nucleoproteins gave marked precipitation with the homologous sera exclusively. These fractions exhibit different migration rates in agar gel. After separation of the antigen extracted with desoxycholate, polysaccharides which were qualitatively different from those contained in the complex, could be isolated from the same strains. They contain rhamnose and probably represent the polysaccharides of the cell wall.

Upon precipitation with HCl at pH 3.5, the extract obtained by means of desoxycholate solution from the enterococcus strain 204 (group D) separates into 2 protein fractions which display different diffusion rates in agar gel. After separation of the first antigen, a single polysaccharide could be isolated by means of 1 per cent HCl from this strain. This polysaccharide diffuses very rapidly in agar gel, is formed of glucose, galactose, xylose, rhamnose and hexosamines, represents the polysaccharide of the cell wall, and is type-specific.

The antigens isolated from the enterococcus strain 204 differ from those of the other streptococci investigated, in-as-much as their specificity is not restricted to the homologous serum.

# L'AGGLUTINATION DES HÉMATIES D'HOMME, FORMOLÉES ET TANNÉES, PAR LES SÉRUMS HUMAINS (AGGLUTINATION HFT)

## NOTE I. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE, DÉFINITION DE « L'UNITÉ HÉMAGGLUTINANTE CONVENTIONNELLE » (UHc) ET INTERPRÉTATION STATISTIQUE DES RÉSULTATS OBTENUS AVEC 55 SÉRUMS NORMAUX.

par

R. Weinbach

*(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino »)*

— Manuscrit reçu le 9 novembre 1960 —

Au cours de nos recherches, nous avons observé que le sérum humain est capable d'agglutiner les hématies formolées et tannées (HFT) de l'homme. Nous ne connaissons à ce sujet que deux observations: Vorlaender (9) a constaté qu'en général, les sérums humains provenant de sujets avec hépatopathies agglutinent les hématies tannées; Hoenig et Hoenigova (6) ont approfondi ce phénomène, mais à notre opinion, la technique qu'ils ont utilisée était peu satisfaisante.

Ces indications, ainsi que nos observations, et surtout le fait que ce phénomène semble venir en contradiction avec les règles de la sérologie des groupes sanguins, nous ont déterminés à l'étudier et à essayer d'élaborer une méthode reproductible pour l'agglutination HFT.

### MATÉRIEL ET MÉTHODE

a) *Hématies humaines formolées* (HF), groupe 0, rh, préparées selon une technique originale (10), suspendues en eau distillée, merthiolée 0,01%, de manière à contenir $10^6$ éléments cellulaires par mmc représentant la suspension—mère de HF, considérée comme 10%; elle doit être conservée au frigidaire (+4°C) et peut être employée plus de 2 années.

b) *Tampon phosphate physiologique*, pH = 7,2 (23,9 ml $KH_2PC_4$ 0,15 M + 76,0 ml $Na_2HPO_4$ 0,15 M + 100 ml solution NaCl 0,85% merthiolé 0,005%), conservé à la température du laboratoire.

c) *Acide tannique* (Riedel-de-Haën) solution 0,01%, toujours fraîchement préparée: solution 0,1% de tanin en eau distillée, ensuite diluée 1: 10 en tampon phosphate (b).

d) *Diluant:* Polivinyl-pyrrolidon (PVP) (Fluka) 0,5% en tampon (b), obtenu par le mélange en parties égales d'une solution 1% de PVP en eau bidis-

tillée, merthiolée 0,005% et de tampon (b) (conservé à la température du laboratoire).

e) *Sérums :* On a étudié 55 sérums provenant de sujets sains (dont la plupart donneurs de sang) et 8 sérums de malades d' hépatite virotique (récoltés pendant la première semaine de maladie). Les sérums ont été obtenus par coagulation spontanée du sang et séparation du caillot à la température du laboratoire. Il faut éviter une baisse de température, tant que le sérum se trouve en contact avec ses propres hématies. Les sérums qui ne sont pas titrés le jour même, doivent être conservés pendant la nuit au frigidaire.

A. *Tannage des* HF *:* 1 volume de suspension-mère de HF (a) + 1 volume solution d'acide tannique (c) gardés pendant 30 minutes à 37°C, agités plusieurs fois, lavés une seule fois avec 5 vol. tampon (b) et suspendus 10% en tampon (b) = suspension-mère de HFT. Conservation à + 4°C. La préparation d'une plus grande quantité de suspension-mère de HFT est indiquée, vu qu'elle se conserve à +4°C plus de deux années.

B. *La suspension de* HFT, pour la réaction se prépare en ajoutant 1 ml suspension-mère de HFT (A) à 9 ml diluant (d).

I. *L'agglutination-*HFT s'effectue selon la micro-méthode de TAKATSY (8), utilisant des plaques en plexi à 6 rangées par 12 godets (6 mm de diamètre et 5 mm en hauteur), à fond conique, formant un angle de 110°. On dépose dans chaque godet, à l'aide d'un instillateur calibré attaché à une pipette Pasteur, une goutte de diluant (d) (1 goutte = 0,025 ml). A l'aide d'une anse en spirale calibrée (capacité = 0,025 ml) on introduit le sérum à examiner (e) dans le premier godet de la première rangée, en le mélangeant avec le diluant par un mouvement rotatoire de l'anse spiralée; on introduit ensuite l'anse dans le second godet de la première rangée, on mélange de nouveau, on l'introduit dans le 3-e godet, et ainsi de suite. De cette manière on obtient une série de dilutions en progression géométrique 1: 2, 1: 4, 1:8, etc. Par l'emploi concomitant de 6 anses spiralées, on peut diluer 6 sérums à la fois. La dilution initiale du sérum peut être modifiée en introduisant dans le premier godet de chaque rangée 2 ou 4 gouttes au lieu d'une; on obtient ainsi une dilution 1: 3, respectivement 1: 5 qui sera diluée ensuite de la même manière. On ajoute dans tous les godets une goutte ≒ (0,025 ml) de suspension 1% HFT (B), doublant ainsi les dilutions du sérum. Pour déterminer le titre, on tient compte de la dilution réelle du sérum. Témoin pour les hématies: 1 goutte de diluant (d) + 1 goutte suspension d'HFT (B). Le contenu final des godets est mélangé par mouvements circulaires horizontaux de la plaque.

II. *Lecture et interprétation de l'agglutination* HFT. La lecture s'effectue sur fond blanc, après 45 minutes, à la température du laboratoire.

L'interprétation se fait d'après l'aspect du sédiment des HFT:

| | |
|---|---|
| Le sédiment couvre uniformément le fond du godet ..... | agglutination (++++) |
| Même aspect comme pour (++++) mais présentant une ébauche d'anneau à l'intérieur ..... | agglutination (+++) |
| Sédiment en forme d'anneau ..... | agglutination (++) |
| Même aspect comme pour (++) mais plus réduit | agglutination (+) |
| Sédiment compact, en forme de bouton ..... | 0 (réaction négative) |

Le fait qu'au cours des titrages nous avons trouvé des sérums qui tout en présentant le même titre final différaient par l'intensité de l'hémagglutination, nous a déterminés d'établir pour chaque réaction 2 titres:

*le titre final* ($T_f$) = la dilution réelle du sérum déterminant encore une hémagglutination visible, et

*le titre de l'hémagglutination* 50% ($T_{50}$) = la dilution réelle du sérum déterminant l'agglutination (++).

Néanmoins, il est possible que le $T_{50}$ n'apparaisse pas toujours au cours du titrage d'un sérum. En ce cas, on calcule le $T_{50}$ en employant le logarithme de la valeur réciproque de la dilution réelle du sérum, qui se situe immédiatement au-dessus et respectivement au-dessous du $T_{50}$ [par exemple: agglutination (+) pour la dilution réelle du sérum soit 1: 80 et agglutination (+++) pour la dilution réelle du sérum soit 1:40; le $T_{50}$ se trouve entre ces deux dilutions, n'étant pas 1: 60, mais le log 40+0,150 (la moitié du log 2, vu que 2 représente le facteur de dilution) donc 1,602+0,150 = 1,752 = log 56,5; soit le $T_{50}$ = 1: 56 ou log 80 − 0,150 = 1,903 − 0,150 = 1,753 = log 56,5 donc $T_{50}$ est de même 1: 56. Autre exemple: l'agglutination (+++) à 1: 40, réaction négative à 1:80; le $T_{50}$ = log 40 + 0,100 = 1,602 + 0,100 = 1,702 = log 50,3 = 1: 50]. Le résultat de l'agglutination HFT s'exprime en « unités hémagglutinantes conventionnelles » (UHC).

III. *Calcul des « unités hémagglutinantes conventionnelles »* (UHC): afin d'établir une liaison entre le $T_f$ et $T_{50}$ et d'exprimer cette relation par une seule valeur, nous avons défini l'UHC par la formule:

$$\text{UHC} = \sqrt[5]{T_f \cdot T_{50}} \quad \text{ou} \quad \log \text{UHC} = (\log T_f + \log T_{50}) \cdot \frac{1}{5}$$

ou: $T_f$ = la valeur réciproque du titre final et $T_{50}$ = la valeur réciproque pour l'hémagglutination 50%.

Appliquant cette formule aux exemples donnés, nous trouvons pour le premier cas:

$$1{,}903 + 1{,}752 = 3{,}655 \cdot \frac{1}{5} = 0{,}731 = \log 5{,}38 = 5{,}38 \text{ UHC}; \text{ pour le second cas:}$$

$$1{,}602 + 1{,}702 = 3{,}304 \cdot \frac{1}{5} = 0{,}661 = \log 4{,}58 = 4{,}58 \text{ UHC}.$$

Afin de faciliter la détermination de la valeur des UHC on peut employer le nomogramme représenté dans la fig. 1, qui est calculé pour les dilutions 1: 20, 1: 40, 1: 80, etc. (fig. 1).

Sur l'échelle de gauche sont consignées les valeurs réciproques du titre final ($T_f$) et sur l'échelle de droite les valeurs réciproques de l'hémagglutination 50% ($T_{50}$). La valeur des UHC se trouve à l'intersection de l'échelle médiane avec la droite qui unit les valeurs respectives $T_f$ et $T_{50}$. Les valeurs $T_{50}$ (également calculées pour les dilutions 1: 20, 1: 40, etc.) peuvent s'obtenir directement, sans calcul, sur l'échelle de droite à l'aide de la petite échelle auxiliaire (à droite en haut), notamment:

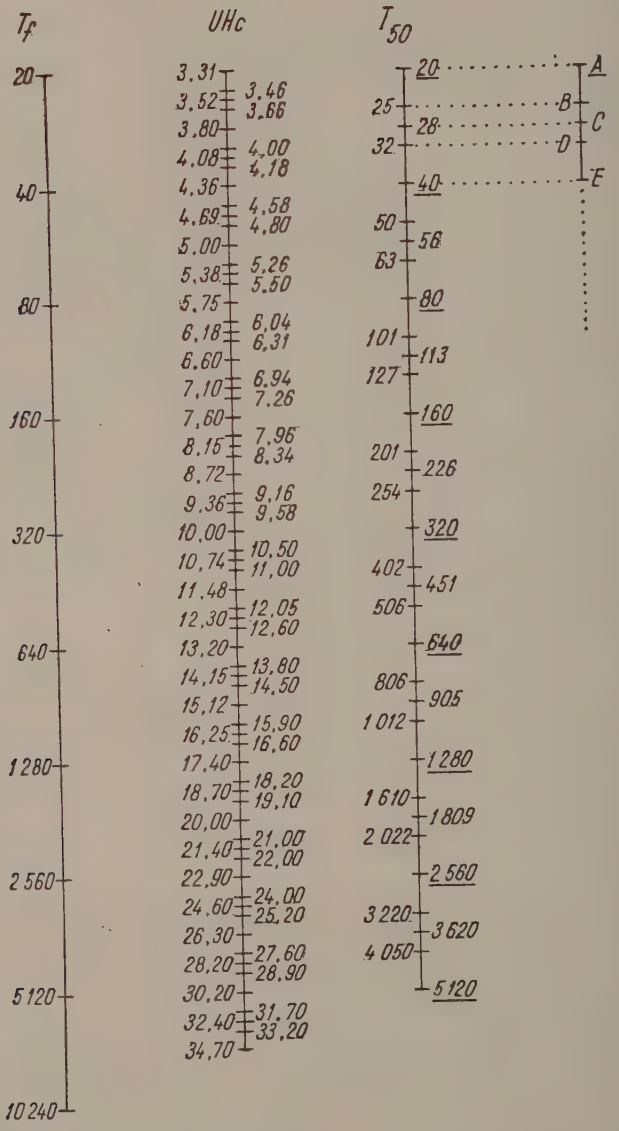



*Fig.* 1. Nomogramme pour la détermination des valeurs UHc, avec échelle auxiliaire (à droite en haut) pour trouver la valeurs $T_{50}$, calculée pour les dilutions 1:20, 1:40, 1:80, etc.

| si pour | le résultat est | et pour | le résultat est | on choisit |
|---|---|---|---|---|
| A | agglutination (++++) | E | 0 | la valeur C |
| A | agglutination (++++) | E | agglutination (+) | la valeur D |
| A | agglutination (+++) | E | 0 | la valeur B |
| A | agglutination (+++) | E | agglutination (+) | la valeur C |
| A | agglutination (++) | E | agglutination (+) ou 0 | la valeur A |
| A | agglutination (++++) ou (+++) | E | agglutination (++) | la valeur E |

Les valeurs A de l'échelle $T_{50}$ sont soulignées.

IV. Pour l'interprétation des résultats nous avons appliqué les méthodes usuelles de statistique mathématique.

## RÉSULTATS

On a examiné d'abord à l'aide de la méthode décrite 55 sérums provenant de sujets apparemment indemnes. Le tableau I montre la distribution de ces sérums, selon leur contenu en UHc.

*Tableau I*

**Distribution des 55 sérums provenant de sujets apparemment indemnes, selon le contenu des sérums en UHc.**

| | Contenu en UHc | | | | | | | | | | Total |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | sous 3 | de 3 jusqu'en dessous de 4 | de 4 jusqu'en dessous de 5 | de 5 jusqu'en dessous de 6 | de 6 jusqu'en dessous de 7 | de 7 jusqu'en dessous de 8 | de 8 jusqu'en dessous de 9 | de 9 jusqu'en dessous de 10 | de 10 jusqu'en dessous de 11 | Au dessus de 11 | |
| Nombre absolu | 2 | 1 | 4 | 17 | 17 | 9 | 3 | 0 | 2 | 0 | 55 |
| % | 4 | 2 | 7 | 31 | 31 | 16 | 5 | 0 | 4 | 0 | 100 |

La moyenne de toutes les valeurs ($x_i$) $\bar{x}_1 = 6{,}152$ UHc; la source des carrés de déviation $S_{x_i x_i} = 168{,}0507$; le carré de déviation standard $s_1^2 = 3{,}12$ et la déviation standard $s_1 = 1{,}77$. L'erreur moyenne de la moyenne est: $s_{\bar{x}_1} = 0{,}238$. La moyenne du collectif de base, en fonction des différentes probabilités statistiques, acquiert les valeurs suivantes:

| Probabilité statistique | t | $t.s_{\bar{x}_1}$ | Moyenne | |
|---|---|---|---|---|
| | | | inférieure | supérieure |
| 95% | 2,00 | 0,476 | 5,676 | 6,628 |
| 99% | 2,65 | 0,631 | 5,521 | 6,783 |
| 99,27% (équivalent de 3σ) | 3,15 | 0,750 | 5,402 | 6,902 |
| 99,9% | 3,50 | 0,834 | 5,318 | 6,986 |

Il ressort clairement du tableau I, que les sérums des personnes indemnes, groupés en fonction de leur contenu en UHc, donnent une distribution en forme de cloche présentant une assymétrie modérée de droite, dont la limite supérieure se trouve à 9 UHc. Par conséquent, nous proposons que les valeurs inférieures à 9 UHc, soient considérées comme valeurs normales, celles de 9 UHc jusqu'en en dessous de 10 UHc, comme faiblement positives et tous les résultats dépassant 10 UHc comme positifs. (A partir de 10 UHc jusqu'en dessous de 15 UHc = positifs; de 15 UHc jusqu'en dessous de 25 UHc = fortement positifs; dépassant 25 UHc = très fortement positifs).

Afin d'observer le comportement du contenu en UHc en fonction du temps, nous avons examiné 5 échantillons de sérums, provenant du même individu, prélevés à des dates différentes. Les résultats sont consignés dans le tableau II.

*Tableau II*

**Les résultats de l'agglutination HFT, effectuée à différentes dates avec le sérum provenant d'un même individu.**

| Échantillon de sérum | Date du prélèvement | $T_f$ | $T_{50}$ | UHc |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 30.03.1960 | 128 | 100 | 6,62 |
| 2 | 8.04.1960 | 128 | 128 | 6,96 |
| 3 | 23.04.1960 | 128 | 64 | 6,08 |
| 4 | 4.05.1960 | 128 | 100 | 6,62 |
| 5 | 9.06.1960 | 128 | 128 | 6,96 |

$\bar{x} = 6{,}648$ UHc; $s = 0{,}36$; $s_{\bar{x}} = 0{,}161$

Selon les données du tableau II, il ressort que le facteur sérique hémagglutinant d'une même personne, apparemment saine, présente une certaine constance.

Le titrage des 8 sérums provenant de malades d'hépatite virotique (2), a donné une moyenne, $\bar{x}_2 = 13{,}46$ UHc. Est-il certain que cette moyenne diffère de la moyenne obtenue chez le collectif d'individus sains? La différence $\bar{x}_2 - M$ (pour $\bar{x}_1$) $= 13{,}46 - 6{,}152 = 7{,}308$, représente de 11,7 fois l'erreur moyenne $1{,}88 : \sqrt{8} = 0{,}625$. La différence est significative, vu que par ce fait la probabilité de 99,9% ($\alpha = 0{,}1\%$) avec $u = 3{,}29$ est de beaucoup dépassée.

En plus, on a observé chez une série de sérums normaux l'apparition d'une prozone, qui a servi d'ailleurs à HOENIG et HOENIGOVA pour différencier les sérums négatifs des sérums positifs. Il est donc indiqué d'effectuer le titrage du sérum à partir d'une dilution 1/10 et de ne pas faire de réactions d'épreuve avec des sérums non-dilués, vu que l'apparition d'une prozone chez les sérums à contenu accru en UHc est également possible.

DISCUSSION

En 1956, HOENIG et HOENIGOVA (6) ont montré que les hématies d'homme, traitées au tanin, sont agglutinées dans 9% des cas (75 échantillons) par des sérums d'individus sains et dans 84% des cas (97 échantillons) par des sérums provenant de malades d'hépatite virotique. VORLAENDER (9) confirme, en principe, cette observation, constatant qu'en général les hématies labilisées par un traitement au tanin — ou à la trypsine — sont souvent agglutinées par les sérums des personnes présentant une hépatopathie. Néanmoins, un travail effectué afin de vérifier ces données (3) n'a pu confirmer les résultats obtenus par HOENIG et HOENIGOVA, probablement à cause de la méthode employée par ces auteurs. Ces données contradictoires nous ont déterminés à mettre au point une technique reproductible pour l'agglutination des hématies tannées, les hématies préalablement formolées paraissant particulièrement indiquées à ce but (10).

En premier lieu, nous nous sommes demandé quel est le mécanisme d'après lequel se produit l'agglutination des HFT humaines par les sérums d'hommes normaux, vu que les deux composants de la réaction proviennent d'une même espèce. Le tannage des HF joue certainement un rôle dans l'agglutination HFT, car du point de vue physique le tanin provoque une baisse de l'hydrophilie et par conséquent une hausse de la capacité réactionnelle des hématies. Ce fait ne suffit pourtant pas à expliquer l'agglutination HFT par les sérums normaux; la participation d'un facteur sérique dans cette réaction s'impose. On peut supposer qu'il s'agit d'un composant sérique normal qui se trouve chez presque tous les individus, bien qu'en quantités différentes, mais présentant, paraît-il, une certaine constance (voir tableau II).

Selon les données de HOENIG et HOENIGOVA (6), le facteur responsable de l'agglutination des hématies tannées se trouve dans la fraction globulinique du sérum, n'étant pas identique au complément, à la protrombine ou à la proaccélérine.

Nous ne considérons pas que l'agglutinine HFT correspond à un isoanticorps connu ou encore inconnu, étant donné que la réaction a été effectuée avec des hématies du groupe 0, rh, et que nous avons observé trop souvent la présence du facteur agglutinant des HFT dans les sérums normaux, pour que ce fait soit passé inaperçu, vu le volume des recherches effectuées, dans les dernières décades, au sujet des groupes sanguins.

Une autre explication de l'agglutination HFT par les sérums normaux serait la participation dans la réaction de la soi-disant pan-hémagglutinine. Jusqu'à présent, on ignorait que les hématies peuvent devenir pan-hémagglutinables par un traitement au tanin. Cette hypothèse nous paraît la moins plausible.

Il est connu que l'hémolyse des érythrocytes tannées, induite par les sérums frais, est déterminée par la properdine (4). Les HFT pourraient toutefois être agglutinées par la properdine, vu que les HF ne sont pas lysables (10). Une série de tentatives d'agglutiner les HFT d'homme avec du sérum de lapin (qui contient à peu près autant de properdine que le sérum humain) ont échoué. Il est dificile de supposer que la properdine humaine agglutine les HFT, et que celle des lapins ne les agglutine pas. D'autre part, la properdine est complètement inactivée

après 30 minutes à 56°C (1). Des recherches personnelles ont montré que le facteur sérique qui agglutine les HFT n'est nullement altéré par chauffage pendant 2 heures à 56°C du sérum dilué; toutefois il diminue légèrement en le traitant de même pendant 3 heures. Cette constatation est en contradiction avec l'observation de HOENIG et HOENIGOVA (6), qui indiquent la disparition totale de la capacité du sérum non-dilué d'agglutiner les hématies tannées, après avoir subi ce traitement pendant 2 heures; on pourrait expliquer cette inactivation par la formation (sous l'influence de la chaleur) de simplexes anticorps-sérumalbumine, ainsi que l'ont montré BOWDEN et KLECZOWSKI (2). On peut éviter ce phénomène en utilisant un sérum dilué. Nous avons toujours obtenu des valeurs normales des UHC pour les sérums provenant de malades avec des néoplasies malignes (voir note III). Ce fait plaide également contre l'identité du facteur sérique agglutinant avec la properdine très diminuée chez cette catégorie de malades (7). La preuve directe de la non-participation de la properdine à l'agglutination HFT (par l'étude des sérums RP) n'a pas été faite jusqu'à présent.

Enfin, on peut encore émettre l'hypothèse que le facteur qui agglutine les HFT du sérum normal soit un auto-anticorps, non un auto-anticorps hépatique, vu qu'il ne peut être absorbé à l'aide d'extraits de parenchyme hépatique (9), mais un auto-anticorps hématique. Il est possible que les modifications de la surface des hématies, déterminées par le tanin, soient similaires à celles produites dans l'organisme par le processus de destruction physiologique des hématies. Ces altérations des érythrocytes « in vivo » pourraient former un stimulus antigénique, capable d'induire un anticorps envers les propres hématies, agissant ainsi sur l'agglutination HFT. Le titrage — justement fondé du point de vue théorique — de la properdine par le test de l'hémolyse (4) en utilisant du sérum natif et des érythrocytes tannées, a échoué en pratique (5). Il se peut que cet anticorps antihématies tannées, présumé par nous, y soit responsable, vu que la properdine hautement purifiée et par conséquent dépourvue d'anticorps peut être déterminée quantitativement par cette méthode (5).

Aucune des hypothèses énumérées par rapport à la nature du facteur sérique agglutinant des HFT n'est définitivement confirmée ou infirmée. Des recherches ultérieures contribueront néanmoins à l'élucidation du problème.

RÉSUMÉ

1. On établit une méthode pour l'agglutination des hématies humaines formolées et tannées (HFT) par les sérums d'homme. Le titrage se fait selon la micro-tehnique de TAKATSY.

2. Les résultats de la réaction sont donnés en unités hémagglutinantes conventionnelles (UHC) qui expriment la relation existant entre le titre final ($T_f$) et l'hémagglutination 50% ($T_{50}$). Le calcul des UHC se fait d'après la formule $\sqrt[5]{T_f \cdot T_{50}}$.

3. La zone des résultats négatifs a été établie en dessous de 9 UHC. Les valeurs dépassant 10 UHC sont considérées positives et celles comprises entre 9 UHC et 10 UHC faiblement positives.

4. Avec les 55 sérums normaux on a obtenu 96% résultats négatifs et 4% résultats positifs.

5. Le titrage préliminaire de 8 sérums provenant de malades d'hépatite virotique a relevé un contenu moyen en UHC qui dépasse de façon significative la moyenne en UHC des sérums normaux.

6. Le contenu en UHC des sérums normaux paraît être relativement constant pour la même personne.

7. On a émis et discuté une série d'hypothèses concernant la nature du facteur présent dans les sérums normaux, responsable de l'agglutination des HFT.

Nous tenons à exprimer nos remerciements au Dr. MARILENA FOTINO de l'Institut d'Hématologie et Transfusion de Bucarest, pour avoir gracieusement mis à notre disposition les sérums des donneurs, ainsi qu'au Dr. N. MOLDOVAN de l'Hôpital No. 2 de Maladies contagieuses de Bucarest, pour les sérums provenant des malades d'hépatite virotique.

BIBLIOGRAPHIE

1. BACKHAUSZ R. — Das Properdin-System (Revue générale) Ann. Immun. Hung., 1959, **2**, 19.
2. BOWDEN F. C. et KLECZOWSKI A. — Brit. J. Exp. Path., 1942, **23**. 178.
3. CAJAL N., POPESCO-DANESCO G. — dans N. CAJAL. — Diagnosticul de Laborator al Inframicrobiozelor umane, Bucureşti, Ed. Ac. R.P.R., 1958, 523.
4. HINZ C. F. jr. et PILLEMER L. — J. Clin. Invest., 1955, **34**, 912.
5. HINZ C. F., ABRAHAM J. et PILLEMER L. — Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1957, **94**, 230.
6. HOENIG V. et HOENIGOVA J. — Presse Médicale, 1956, **64**, 1639.
7. SOUTHAM C. M. et PILLEMER L. — Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1959, **63**, 102.
8. TAKATSY G. — Acta Microbiol., Acad. Sci. Hung., 1955, **3**, 191.
9. VORLAENDER K. O. — dans P. MIESCHER und K. O. VORLAENDER. — Immunpathologie in Klinik und Forschung, Stuttgart, G. Thieme, 1957, 382 et 417.
10. WEINBACH R. — Microbiologia (Bucarest), 1958, **3**, 213.

## АГГЛЮТИНАЦИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА, ОБРАБОТАННЫХ ФОРМАЛИНОМ И ТАНИНОМ, В ПРИСУТСТВИИ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ СЫВОРОТОК (АГГЛЮТИНАЦИЯ ФТЭ)

### I. ОПИСАНИЕ МЕТОДА, ОПРЕДЕЛЕНИЕ «УСЛОВНОЙ ГЕМАГГЛЮТИНИРУЮЩЕЙ ЕДИНИЦЫ (уГЕ) И СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ С 55 НОРМАЛЬНЫМИ СЫВОРОТКАМИ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

1. Описывают метод агглютинации эритроцитов человека, обработанных формалином и танином (ФТЭ) в присутствии человеческих сывороток. Титрование проводится в виде микрореакции, по Такаци.

2. Результаты реакции даны в «условных гемагглютинирующих единицах» (УГЕ), выражающих отношение, существующее между окончательным титром (To) и 50%-ной агглютинацией ($T_{50}$). Подсчет уГЕ проводится по формуле $\sqrt[5]{T_f \cdot T_{50}}$

3. Отрицательными считаются результаты, находящиеся в зоне 9 уГЕ. Цифры, превосходящие 10 уГЕ считаются положительными, цифры, находящиеся между 9 и 10 уГЕ — слабоположительными.

4. При исследовании 55 нормальных сывороток получены отрицательные результаты в 96% случаев и положительные в 4%.

5. Среднее содержание уГЕ, обнаруженное при предварительном исследовании 8 сывороток, происходящих от больных вирусным гепатитом, значительно отличается от средней цифры уГЕ в нормальных сыворотках.

6. Содержание уГЕ в нормальных сыворотках кажется относительно стойким для одного и того же лица.

7. Выдвигают и обсуждают ряд гипотез в отношении природы фактора агглютинирующего ФТЭ в нормальных сыворотках.

## DIE AGGLUTINATION TANNINVORBEHANDELTER MENSCHLICHER FORMOL-ERYTHROCYTEN DURCH HUMANSERA (TFE-AGGLUTINATION)

### I. BESCHREIBUNG DER METHODIK, DEFINITION DER „KONVENTIONELLEN HÄMAGGLUTINATIONS-EINHEIT" (kHE) UND STATISTICHE AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE VON 55 NORMALSERA.


### ZUSAMMENFASSUNG

1. Es wird die Methodik der Agglutination formol- und tanninvorbehandelter Human-Erythrocyten (TFE) durch Normalsera beschrieben. Die Auswertung erfolgte mittels der Mikromethode nach TAKÁTSY.

2. Die Ergebnisse werden in „konventionellen Hämagglutinations-Einheiten" (kHE) gegeben, die den Zusammenhang zwischen dem Endtiter ($T_E$) und dem 50% Hämagglutinations-Titer ($T_{50}$) ausdrücken. Die Berechnung der kHE wird nach der Formel $\sqrt[5]{T_E \cdot T_{50}}$ vorgenommen.

3. Der Bereich negativer Resultate wurde bis unter 9 kHE festgelegt. Werte über 10 kHE werden als positiv, die zwischen 9 kHE und 10 kHE liegenden als schwach positiv angesehen.

4. Die untersuchten 55 Normalsera ergaben in 96% negative und in 4% positive Ergebnisse.

5. Die vorläufige Auswertung von 8 Hepatitis-Sera ergab einen Mittelwert, der vom Mittelwert der Normalsera signifikant verschieden ist.

6. Der kHE-Gehalt von Normalsera scheint für eine gegebene Person relativ konstant zu sein.

7. Uber das Wesen des TFE-agglutinierenden Serumfaktors wurden einige Hypothesen aufgestellt und besprochen.


## THE AGGLUTINATION OF TANNED FORMOLIZED HUMAN ERYTHROCYTES BY HUMAN SERA (TFE-AGGLUTINATION)

### I. DESCRIPTION OF THE METHOD, DEFINITION OF A „CONVENTIONAL HAEMAGGLUTINATING UNIT" (CHU) AND STATISTICAL PROCESSING OF THE RESULTS OBTAINED BY TESTING 55 NORMAL HUMAN SERA


### SUMMARY

1. A method for the agglutination of tanned formolized human erythrocytes (TFE) by human sera is described. Titrations are carried out by means of TAKATSY's microreaction.

2. The results of the reaction are expressed in „conventional haemagglutinating units" (CHU) resulting from the relation between the end point titre ($T_f$) and 50 per cent haemagglutination ($T_{50}$). CHU are computed according to the formula $\sqrt[5]{T_f \cdot T_{50}}$

3. The range of negative results was found to lie below 9 CHU. Figures above 10 CHU are considered as positive, and those between 9 CHU and 10 CHU are weakly positive results.

4. The 55 normal sera tested yielded 96 per cent negative and 4 per cent positive results.

5. Preliminary titrations of 8 sera collected from patients suffering from virus hepatitis yielded CHU contents whose average was significantly different from the average CHU contents of normal sera.

6. The CHU contents of normal sera appear to be comparatively constant in the same subject.

7. Several hypotheses are put forth and discussed as regards the nature of TFE-agglutinins in normal sera.

# L'AGGLUTINATION DES HÉMATIES D'HOMME, FORMOLÉES ET TANNÉES, PAR LES SÉRUMS HUMAINS (AGGLUTINATION HFT)

## NOTE II. L'APPLICABILITÉ DU TEST HFT EN VUE DE LA SÉLECTION OBJECTIVE DES DONNEURS DE SANG, CAPABLES DE TRANSMETTRE L'HÉPATITE VIROTIQUE.

par

R. Weinbach, N. Moldovan et P. Steresco

*(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » et de l'Hôpital No. 2 de Maladies contagieuses de Bucarest)*

— Manuscrit reçu le 9 novembre 1960 —

Dans une note antérieure (24) on a établi que le contenu en « unités hémagglutinantes conventionnelles » (UHC) est plus élevé dans le sérum des malades d'hépatite virotique (HV), que dans les sérums normaux. On a essayé d'étudier à fond cette observation, afin d'établir si l'agglutination HFT pourrait être utilisée pour le diagnostic de la HV (voir note III) et si cette réaction pourrait assurer la sélection objective des donneurs de sang, capables de transmettre la HV. A cette fin on a examiné, à l'aide du test HFT, 144 malades souffrant de différentes affections, internés à l'Hôpital No. 2 de Maladies contagieuses (Bucarest). Chez 96 de ces malades on a confirmé le diagnostic de HV. Parmi ces derniers, nous avons sélectionné, au hasard, un nombre de 42 sérums provenant de formes ictériques en différentes phases de la maladie. Les résultats de la réaction HFT, obtenus avec ces sérums, ont été interprétés par la méthode statistique afin d'établir si ce test pourrait donner des informations sur la fonction hépatique et si la réaction varierait au cours de l'évolution de la maladie.

La technique de l'agglutination HFT correspond intégralement à celle décrite dans la note I (24).

### RÉSULTATS

Nous avons observé, dès le début de cette étude, que les réactions positives étaient plus fréquentes chez les malades dont les sérums ont été examinés dans la phase initiale de la HV. Pour cette raison il aurait été erronné de donner une distribution procentuelle des résultats du test HFT pour la HV, ainsi que l'ont fait par exemple Hoenig et Hoenigova (8). Par contre, nous avons essayé de voir s'il n'était pas possible d'établir une corrélation entre le contenu des sérums en UHC et l'évolution de la maladie. Afin de saisir dans quelle mesure l'agglutination HFT peut fournir des indications sur la fonction de la cellule hépatique, nous avons également recherché l'existence d'un éventuel rapport entre cette

réaction et deux des épreuves hépatiques de laboratoire (valeur de l'aldolase sérique et la réaction au thymol).

Vu qu'en général le début de la maladie est difficile à situer, parce qu'il dépend des indications imprécises fournies par le malade, nous avons choisi pour l'étude de l'évolution des UHC dans les sérums des malades de HV le moment de l'apparition de l'ictère. Selon BEDSON et coll. (1), les premiers symptômes précèdent de 4 jusqu'à 7 jours l'ictère, et d'après RIVERS (20) de 1 jusqu'à 21 jours — en moyenne 5 jours. Il est toutefois connu que les symptômes préictériques ainsi que l'ictère même, ne sont pas obligatoires.

Des 42 sérums examinés dans le but d'établir une corrélation entre le contenu en UHC du sérum et la période écoulée depuis l'apparition de l'ictère, 9 ont été négatifs ($< 9$ UHC), 4 faiblement positifs (de 9 jusqu'en dessous de 10 UHC et 29 positifs ($> 10$ UHC). En vue de l'interprétation statistique des données, on a choisi pour les valeurs x l'intervalle en jours écoulés depuis l'apparition de l'ictère et pour les valeurs y le logarithme du contenu en UHC du sérum respectif. Les valeurs trouvées pour x: la plus petite = 2 et la plus grande = 18; pour y: la plus grande = 1,301 (= 20,0 UHC) et la plus petite = 0,764 (= 5,81 UHC); on obtient:

$$\bar{x} = 7{,}0;\ \bar{y} = 1{,}07\ (= 11{,}74\ \text{UHC});$$
$$S_{xx} = 746;\ S_{yy} = 0{,}942;\ S_{xy} = -20{,}761$$

Le coefficient de corrélation $r_{xy} = -0{,}784$ dépasse la limite de probabilité de 99,9% = 0,49 (pour 40 degrés de liberté). Calculé selon la distribution t $\left(\frac{r\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}\right)$, il résulte $t = 7{,}95 > 3{,}55$ (pour la probabilité de 99,9% et 40 degrés de liberté). Donc, la corrélation est significative.

L'équation de la droite de régression pour les valeurs x est

$$y_R = -0{,}0278x + 1{,}2646$$

avec une erreur moyenne (pour la probabilité de 99,9%)

$$s_{y_R} = 0{,}0035 \cdot \sqrt{17{,}8 + (x-7)^2}$$

L'équation de la droite de régression pour les valeurs y est

$$x_R = -22\ y + 30{,}57$$

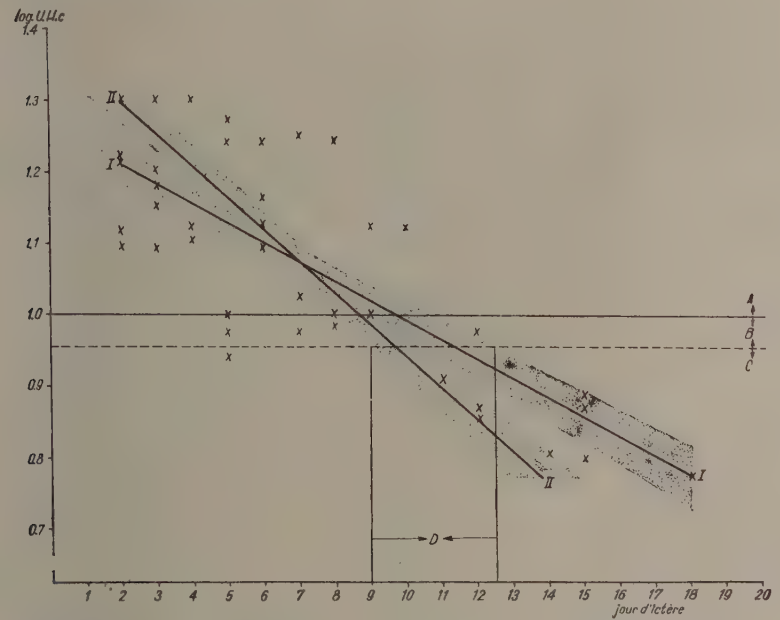
avec une erreur moyenne (pour la probabilité de 99,9%)

$$s_{x_R} = 2{,}75 \cdot \sqrt{0{,}0224 + (y-1{,}07)^2}$$

Sur le graphique de la corrélation (graphique 1) sont consignés les résultats obtenus, ainsi que les 2 droites de régression. Ces dernières s'entrecroisent au point qui indique les moyennes calculées. L'erreur moyenne de chaque droite de régression est également representée.

Il résulte du graphique 1 que l'agglutination HFT devient négative entre le 9-e et le 12-e jour d'ictère. Ces limites ne sont pas valables pour un nombre restreint de résultats fournis par d'autres sérums de HV examinés (voir note III).

On a examiné à l'aide du test HFT plusieurs échantillons de sérum prélevés de 10 malades de HV au cours de l'évolution de la maladie. Les résultats sont consignés dans le tableau I (le calcul de la corrélation n'a pas compris tous les cas exposés dans le tableau I).




*Graphique* 1. La corrélation entre le résultat de l'agglutination HFT et le nombre de jours écoulés depuis l'apparition de l'ictère chez les malades d'hépatite virotique.

Légende: X = résultats de l'agglutination HFT
I = la droite de régression x
II = la droite de régression y
zone pointillée: erreur moyenne des droites de régression (pour la probabilité de 99.9%).
A = zone de positivité de la réaction
B = zone de faible positivité de la réaction
C = zone de négativité de la réaction
D = zone de négativation du test HFT (pour la probabilité de 99,9%).

Contrairement à la constance du titre sérique en UHC chez les sujets sains (voir tableau II, note I), chez les malades de HV, ainsi qu'il ressort du tableau I, ce titre varie avec l'évolution de la maladie.

On n'a réussi à établir aucune corrélation significative entre les résultats de l'agglutination HFT et le test de l'aldolase sérique ou celui au thymol. Il semble donc, que le test HFT ne peut donner des indications sur la fonction hépatique; aucune agglutination HFT positive n'a été enregistrée dans les cas de cirrhose hépatique ou d'hépatite chronique qui présentaient des valeurs nettement positives pour le test du thymol (voir note III).

*Tableau I*

**Le comportement de l'agglutination HFT pendant l'évolution de la maladie chez 10 malades d'hépatite virotique**

| Cas | Malade | Diagnostic | Date du prélèvement | Jour | | Résultat |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | de maladie | d'ictère | |
| 1 | C.M. | HV | 20.09.1960 | 9 | 3 | 20,00 UHC |
| | | | 4.10.1960 | 23 | 17 | 8,72 UHC |
| 2 | J.G. | HV | 22.09.1960 | 10 | 3 | 12,30 UHC |
| | | | 6.10.1960 | 24 | 17 | 8,72 UHC |
| 3 | G.B. | HV | 22.09.1960 | 14 | 2 | 20,00 UHC |
| | | | 4.10,1960 | 26 | 14 | 7,10 UHC |
| 4 | N.M. | HV | 14.09.1960 | 21 | 3 | 15,12 UHC |
| | | | 24.09.1960 | 31 | 13 | 10,50 UHC |
| 5 | S.A. | HV | 15.09.1960 | 7 | 4 | 9,36 UHC |
| | | | 24.09.1960 | 16 | 13 | 5,50 UHC |
| 6 | D.E. | HV | 14.09.1960 | 13 | 4 | 20,00 UHC |
| | | | 24.09.1960 | 23 | 14 | 9,58 UHC |
| | | | 11.10.1960 | 40 | 31 | 7,60 UHC |
| 7 | S.M. | HV | 15.09.1960 | 8 | 2 | 16,25 UHC |
| | | | 24.09.1960 | 17 | 11 | 9,36 UHC |
| 8 | M.S. | HV | 15.09.1960 | 8 | 6 | 12,30 UHC |
| | | | 24.09.1960 | 17 | 15 | 9,58 UHC |
| 9 | B.R. | HV | 14.09.1960 | 6 | 0*) | 15,12 UHC |
| | | | 24.09.1960 | 16 | 0 | 8,72 UHC |
| 10 | A.C. | HV | 14.09.1960 | 4 | 0 | 10,50 UHC |
| | | | 24.09.1960 | 14 | 0 | 7,60 UHC |

*) 0 = forme anictérique

## DISCUSSION

L'agglutination HFT devient donc négative entre le 9-e et le 12-e jour après l'apparition de l'ictère, c'est-à-dire le 9-e jusqu'au 19-e jour du début de la maladie, si l'on considère le graphique de corrélation et la durée de la période préictérique citée par BEDSON et coll (1). C'est pour cette raison que les réactions positives ne peuvent être expliquées par la présence de n'importe quel anticorps dans le sérum des malades de HV. On pourrait objecter, que la HV a une incubation de longue durée et que la maladie proprement dite ne débute pas dès l'apparition des premiers symptômes; néanmoins, ce n'est pas un motif pour qu'un éventuel anticorps disparaisse précisément à l'apogée de la maladie, ou, dans le cas d'un anticorps naturel, qu'il revienne au normal. VARGUES et GRENIER (23) ont récemment décrit que les anticorps naturels (tels les anticorps anti-hématies de mouton), augmentent dans les états hyper-γ-globulinémiques (parmi lesquels la HV, la cirrhose hépatique et, en général, les maladies infectieuses) proportionnellement à

la γ-globuline sérique. Il est peu probable que les modifications quantitatives des protéines sériques soient responsables de l'agglutination HFT, tenant compte qu'il n'y a aucune corrélation entre les résultats de la réaction HFT et le test au thymol.

Par contre, les résultats positifs de l'agglutination HFT se superposent, fait frappant, aux données (limitées) de la littérature concernant la présence dans le sang de l'agent étiologique de la HV.

MCCALLUM et BRADLEY (11), ainsi que HAVENS et coll. (5) ont décelé le virus dans le sang le 8-e jour de l'apparition de l'ictère (!), mais non le 30-e jour (5,17). Le virus B n'a pu être mis en évidence dans le sang circulant ni le 28-e et le 32-e jour (6) et ni le 66-e et 144-e jour (12) depuis le début de la maladie. La présence du virus de l'hépatite dans le sang avant l'apparition des premiers symptômes cliniques (le virus A — 3 jours avant (4) et le virus B — 60 jours (18) et 87 jours avant (16) n'est pas surprenante.

Par conséquent, le fait que la réaction HFT soit un indicateur pour la présence dans le sang de l'agent étiologique de la HV est plus que probable.

Ceci nous a menés à envisager deux possibilités: ou bien le virus de l'hépatite détermine directement l'agglutination HFT (hémagglutination virotique véritable), ou bien il intervient de façon indirecte (par l'apparition d'un composant sérique encore inconnu). Nous considérons que le test d'inhibition avec le sérum de convalescent décidera du mécanisme de la réaction.

Les droites de régression, établies seulement à partir du second jour d'ictère, illustrées par le graphique 1, ne représentent que la partie descendante de la courbe de l'évolution des valeurs sériques des UHC chez les malades de HV. Malheureusement, la partie ascendante de cette courbe d'évolution n'a pu être déterminée, bien que son existence soit indubitable; en cas contraire, il existerait une inexplicable lacune entre les valeurs normales et les valeurs fortement augmentées des UHC, trouvées au début de la HV. Des recherches ultérieures devront établir si le moment de la positivation du test HFT se superpose au moment de l'apparition dans le sang du virus de l'hépatite.

Ces considérations permettent de conclure qu'un test HFT positif chez les donneurs de sang pourrait indiquer une virémie (passagère ou non), vu qu'on peut supposer avec une suffisante certitude que ces derniers se trouvent dans la période d'incubation de HV ou souffrent d'une forme sous-clinique de cette affection, ou bien enfin, qu'ils sont des porteurs sains de virus. Ce fait imposerait obligatoirement l'interdiction d'employer de tels sujets comme donneurs de sang, au moins pendant toute la période positive du test HFT.

L'état de porteur de virus de l'hépatite est d'ailleurs plus fréquent qu'on le supposait autrefois. Ainsi MURRAY et coll. (15) ont décrit chez un individu, présentant des tests hépatiques normaux, la persistance dans le sang d'un virus A (?) 8 mois après la guérison de la HV. STOKES et coll. (22) ont découvert parmi les donneurs de sang des porteurs de virus B, chez lesquels les tests hépatiques étaient négatifs et chez lesquels on n'a trouvé, en dépit du fait que leur sang a régulièrement provoqué chez les récepteurs une HV, aucun autre symptôme. Pour l'un de ces donneurs, l'état de porteur a persisté pendant $5^1/_2$ ans. Le péril que représentent ces porteurs en tant que donneurs apparaît clairement, si l'on considère que l'absence de n'importe quel symptôme, ainsi que les épreuves hépatiques négatives, ne permettent point de soupçonner cet état. L'agglutination HFT pourrait être utile surtout dans de pareils cas. En ce qui concerne les

valeurs accrues des UHC, qui peuvent dépasser le 12-e jour de l'apparition de l'ictère, ainsi qu'il ressort du matériel étudié (voir note III), nous pensons qu'elles ne sont pas accidentelles, mais dues à la persistance de la virémie, indiquant le début de l'état de porteur de virus. A ce sujet on doit également rappeler les deux sérums positifs provenant du collectif d'individus sains examinés (voir Note I, tableau I). Si on accepte l'hypothèse que l'agglutination HFT est capable de signaler la présence dans le sang du virus de l'hépatite, alors ces deux sérums proviendraient de porteurs de virus. Cette supposition, qui malheureusement n'a pu être poursuivie, justifierait une étude plus approfondie dans cette direction.

Enfin, il faut citer encore quelques travaux ayant trait à d'autres types d'hémagglutinations que celles dont nous nous sommes servis, effectuées de même avec du sérum de HV et d'autres maladies virotiques. Ainsi, le sérum des malades de HV agglutinerait les hématies de singe (2, 9, 10, 14, 21) et celles de poulet d'un jour (7, 13, 14) en titre plus élevé que les sérums normaux. Les sérums provenant de malades avec mononucléose infectieuse se comporteraient pareillement aux sérums de HV (10, 14); (nous regrettons de n'avoir eu l'occasion d'examiner par le test HFT des malades de mononucléose infectieuse). La tentative d'inhiber cette hémagglutination avec du sérum de convalescent d'hépatite virotique a échoué (14). Le sérum contenant le virus de la fièvre jaune agglutine les hématies de poule, réaction qui peut être empêchée par un sérum contenant des anticorps homologues (19). Le sérum des malades à fièvre pappataci agglutine les érythrocytes humaines natives à $+4^{0}$C, mais non à $20^{0}$ ou $37^{0}$C (3); (la réaction d'inhibition n'a pas été essayée).

Les données énoncées permettent de conclure à la non-spécificité de l'agglutination HFT. Néanmoins, ce test paraît approprié pour dépister précocement la HV, permettant éventuellement la sélection des donneurs de sang, capables de transmettre la HV. La possibilité existe également d'obtenir avec ce test des résultats positifs, en premier lieu dans la mononucléose infectieuse, ce qui ne diminuera probablement pas la valeur de la réaction.

RÉSUMÉ

1. L'agglutination HFT donne des résultats positifs dans la phase initiale de l'hépatite virotique (HV) et revient au normal pendant l'évolution ultérieure de la maladie.

2. Une corrélation significative a été établie entre le résultat du test HFT et les journées écoulées depuis l'apparition de l'ictère. La réaction devient négative entre le 9-e et le 12-e jour d'ictère.

3. On n'a pu établir aucune relation entre le résultat de l'agglutination HFT et la valeur de l'aldolase sérique et du thymol.

4. On suppose que l'agglutination HFT par des sérums provenant de malades de HV est provoquée directement ou indirectement par la présence du virus de l'hépatite dans le sang.

5. On discute la valeur du test HFT en vue de la sélection des donneurs de sang, capables de transmettre la HV.

Nous remercions le collectif du Laboratoire de Biochimie de l'Hôpital No. 2 de Maladies contagieuses de Bucarest, pour avoir mis à notre disposition les résultats des tests de laboratoire des malades étudiés dans le présent travail.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bedson S. P., Downie A. W., Mc Callum F. O. et Stuart-Harris C. H. — Virus and Rickettsial Diseases. Edward Arnold, Ltd, London, 1955.
2. Colobert L., Maitre P. et Duffrene A. — Ann. Inst. Pasteur, 1959, **97**, 560.
3. Cotaesco E. et Badenski G. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie, 1958, **17**, 151.
4. Francis T. jr., Frisch A. W. et Quilligan J. J. jr., — Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1946, **61**, 276.
5. Havens W. P., Ward E., Drill V. A. et Paul J. R. — Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1944, **57**, 206.
6. Havens W. P. — J. exp. Med., 1946, **83**, 441.
7. Havens W. P. — New England J. Med., 1958, **259**, 1202.
8. Hoenig V. et Hoenigova J. — Presse Méd., 1956, **64**, 1639.
9. Hoyt R. E. et Morrison L. M. — Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1956, **93**, 547.
10. Mattila S. — Ann. Med. Exp. et Biol. Fenniae, 1960, **38** 243.
11. McCallum F. O. et Bradley W. H. — Lancet, 1944 **2**, 228.
12. McCallum F. O. et Bauer D. J. — Lancet, 1944, **1**, 622.
13. McCallum R. W., Viggo B., Isacson P. et Riordan J. — Am. J. Med., 1959, **27**, 703.
14. Morris J. A. et Nakamura. K. — J. Lab. a. Clin. Med., 1960, **55**, 726.
15. Murray R., Diefenbach W. C. L., Gellner H., Leone N. C. et Ratner F. — New York J. Med., 1955, **55**, 1145.
16. Neefe J. R., Stokes J., Reinhold J. G. et Lukens F. D. W. — J. Clin. Invest., 1944, **23**, 836.
17. Neefe J. R., Gellis S. S. et Stokes J. — Am. J. Med., 1946, **1**, 3.
18. Paul J. R., Havens W. P., Sabin A. B. et Philip C. B. — J. A.M.A., 1945, **128**, 911.
19. Porterfield J. S. — Tr. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg., 1954, **48**, 261.
20. Rivers T. M. — Viral and Rickettsial Infections of Man. J. B. Lippincott Co, Philadelphia, 1952.
21. Rubin B. A., Kemp H. A. et Bennett H. D. — Science, 1957, **126**, 1117.
22. Stokes J. jr. et al. — J.A.M.A., 1954, **154**, 1059.
23. Vargues R. et Grenier B. — Ann. Inst. Pasteur, 1960. **98**, 728.
24. Weinbach R. — Arch. Roum. Path. Exp. et de Microbiologie, 1961, **20**, 239.

## АГГЛЮТИНАЦИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА, ОБРАБОТАННЫХ ФОРМАЛИНОМ И ТАНИНОМ, В ПРИСУТСТВИИ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ СЫВОРОТОК (АГГЛЮТИНАЦИЯ ФТЭ)

### II. ПРИМЕНИМОСТЬ ТЕСТА ФТЭ. ДЛЯ ОБЪЕКТИВНОГО ОТБОРА ДОНОРОВ КРОВИ, СПОСОБНЫХ ПЕРЕДАВАТЬ ВИРУСНЫЙ ГЕПАТИТ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Анализ результатов теста ФТЭ, проведенного с 41 сывороткой, происходящей от больных вирусным гепатитом, привел к следующим выводам:

1. Агглютинация ФТЭ дает положительные результаты в течение первых двух недель болезни, входя в норму в течение дальнейшего хода болезни.

2. Обнаружена знаменательная корреляция между результатами теста ФТЭ и числом дней, прошедших с момента появления желтухи при ВГ. Реакция становится отрицательной между 9-ым и 12-ым днем от появления желтухи.

3. Не обнаружено наличие какой-либо связи между результатом агглютинации ФТЭ. и результатами реакции на сывороточную альдолазу или реакции, проводимой с тимолом.

4. Предполагают, что агглютинация ФТЭ в присутствии сывороток от больных вирусным гепатитом, указывает — прямым или косвенным обрасом — на присутствие в крови вируса гепатита.

5. Обсуждается значение теста ФТЭ для отбора доноров крови, спосссбных передавать ВГ.

## DIE AGGLUTINATION TANNINVORBEHANDELTER MENSCHLICHER FORMOLERYTHROCYTEN DURCH HUMANSERA (TFE-AGGLUTINATION)

### II. DIE VERWENDBARKEIT DES TFE-TESTES ZUR OBJEKTIVEN AUSLESE VIRUSHEPATITIS (VH)-ÜBERTRAGUNGSFÄHIGER BLUTSPENDER


#### ZUSAMMENFASSUNG

Die bei 42 gesicherten VH-Kranken angewandte TFE-Agglutination ergab folgendes:

1. Die TFE-Agglutination gibt im Frühstadium der Virushepatitis (VH) positive Resultate und fällt im weiteren Verlauf der Erkrankung wieder zur Norm ab.

2. Es wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Ausfall der TFE-Agglutination und dem Tage seit dem Auftreten des Ikterus festgestellt. Danach wird der TFE-Test am 9ten bis 12ten Ikterustag wieder negativ.

3. Es besteht keine statistisch gesicherte Korrelation zwischen dem Ausfall der TFE-Agglutination und dem Ausfall des Aldolase-Testes sowie des Thymol-Trübungs-Testes.

4. Es wird angenommen, daß die TFE-Agglutination die Anwesenheit des Hepatitisvirus im Blut direkt oder indirekt anzuzeigen vermag.

5. Der Wert der TFE-Agglutination für die Auslese VH-übertragungsfähiger Blutspender wird erörtert.


## THE AGGLUTINATION OF TANNED FORMOLIZED HUMAN ERYTHROCYTES BY HUMAN SERA (TFE-AGGLUTINATION)

### II. APPLICABILITY OF THE TFE-TEST TO THE OBJECTIVE SELECTION OF BLOOD DONORS WHO MIGHT TRANSMIT VIRUS HEPATITIS


#### SUMMARY

An analysis of the results of the TFE-test in 41 sera collected from confirmed cases of virus hepatitis has led to the following conclusions:

1. TFE-agglutination yields positive results during the first 2 weeks and returns to normal during the subsequent course of the disease.

2. A significant correlation was found to exist in virus hepatitis between the results of TFE-tests and the number of days elapsed from the onset of jaundice. The reaction becomes negative between the 9th and the 12th day of jaundice.

3. There is no relationship between the results of TFE-agglutination and the results of serum aldolase reactions and thymol tests.

4. TFE agglutination by sera from virus hepatitis cases is presumed directly or indirectly to indicate the presence of the virus in the blood.

5. The value of the TFE-test for the selection of blood donors who might transmit virus hepatitis is discussed.

# RECHERCHES SUR LES PÉNICILLINASES BACTÉRIENNES

## NOTE III. RELATIONS ENTRE L'ÉLABORATION DE LA PÉNICILLINASE ET LA SENSIBILITÉ À LA PÉNICILLINE DES SOUCHES DE *B. ANTHRACIS*

par

THEA HORODNICEANU et A. SĂSĂRMAN

(avec la collaboration technique de RODICA CIULLEY)

*(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service des Cultures Microbiennes)*

— Manuscrit reçu le 8 novembre 1960 —

Le problème des relations existantes entre la résistance à la pénicilline et la production de la pénicillinase a donné lieu à de nombreuses recherches (2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11) dès la découverte de cet enzyme (1), sécrété par un nombre important de bactéries et de champignons.

Contrairement à l'attente, on a constaté que toute une série d'espèces naturellement résistantes à la pénicilline ne sécrètent pas la pénicillinase, tandis que d'autres, sensibles à cet antibiotique, sécrètent l'enzyme (2, 3, 9).

Un parallélisme entre l'intensité de la production de la pénicillinase et le degré de résistance à la pénicilline n'a pu être mis en évidence que dans le cas des souches de staphylocoques récemment isolées des malades (5,6), tandis que les souches résistantes obtenues sous l'influence de l'antibiotique « in vitro », ne sécrétaient pas l'enzyme (3, 10).

Il ressort de ces données que le problème des relations entre la résistance à la pénicilline et la production de la pénicillinase, n'étant pas élucidé jusqu'à présent, nécessite de nouvelles études à ce sujet.

Des recherches antérieures ont montré que certaines souches de *B. anthracis*, tout en étant sensibles à la pénicilline, sécrètent une pénicillinase extracellulaire (2). Néanmoins, la fréquence de la production de la pénicillinase parmi les souches de cette espèce, ainsi que les relations entre ce caractère et le degré de sensibilité à la pénicilline, sont restées inconnues jusqu'à présent.

Dans le but d'élucider ce problème nous avons entrepris l'étude des relations qui existent entre la capacité d'élaborer la pénicillinase et le degré de sensibilité à la pénicilline des souches de *B. anthracis*.

### MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Nous avons étudié en parallèle l'élaboration de la pénicillinase et la sensibilité à la pénicilline de 115 souches de *B. anthracis* d'origine humaine et animale, dont la plupart provenaient de la collection du Prof. N. Stamatin*). Une

*) Nous sommes reconnaissants au Prof. N. Stamatin pour l'amabilité avec laquelle il a mis à notre disposition les souches nécessaires, ainsi que pour ses précieux conseils.

partie des souches ont été conservées un certain temps dans la collection; les autres ont été récemment isolées.

Nous avons étudié l'élaboration de la pénicillinase extracellulaire par ensemencement des germes en bouillon simple; la culture a été incubée pendant 72 heures à 37° et constamment agitée.

Sur un nombre de 37 souches on a poursuivi parallèlement la sécrétion de la pénicillinase, en ajoutant de la pénicilline au milieu de culture.

Afin d'obtenir de la pénicillinase extracellulaire, on a centrifugé les cultures pendant 30 minutes à 3000 t/m.

Le titrage de la pénicillinase a été effectué selon la méthode de MARKOV, BARDAROV et POPOV (8), à l'exception des cas où les quantités réduites d'enzyme ne pouvaient être mises en évidence par cette méthode. Dans de tels cas, le titrage a été fait par la méthode de ILAND et BAINES (7).

MARKOV, BARDAROV et POPOV définissent l'unité de pénicillinase par la quantité minimum d'enzyme capable de détruire 100 U.I. pénicilline dans l'intervalle d'une heure à 37°C et à un pH = 7,0. Pour le titrage, on ajoute 1 ml pénicilline, en concentration de 100 U.I./ml. à des dilutions croissantes de pénicillinase en volume de 1 ml. Le mélange est gardé une heure à 37°C; ensuite on détermine la quantité de pénicilline non-détruite, par la méthode diffusimétrique en surface, utilisant des rondelles en papier filtre. Pour les 2 dilutions (pénicilline et pénicillinase) on emploie un tampon phosphate (pH = 6,9—7,1).

La méthode ILAND et BAINES exprime l'activité de la pénicillinase par la quantité (unités) de pénicilline détruite par 1 ml préparation, dans l'intervalle d'une heure à 37°C. Pour le titrage on ajoute à 1 ml préparation, des concentrations variables de pénicilline en volume de 1 ml. Le mélange est gardé 1 heure à 37°C., en déterminant ensuite la présence de la pénicilline par la méthode diffusimétrique en surface, en utilisant des rondelles en papier filtre.

La sensibilité à la pénicilline a été déterminé par la méthode des dilutions.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats sont exposés dans le tableau I.

L'analyse des données du tableau I montre que toutes les souches étudiées élaborent de la pénicillinase, en quantités variant entre 6,25 et 1600 U/ml. La majorité produit des quantités allant de 200—800 U/ml, la fréquence maximum étant située à 400 U/ml.

Ces titres sont relativement réduits par rapport aux titres donnés par la souche de production de *B. subtilis*, (plus de 25.000 U/ml) (9), étant rapprochés des titres trouvés dans le cas des souches de staphylocoques.

L'étude de la sensibilité à la pénicilline des mêmes 115 souches de *B. anthracis* montre qu'elles sont toutes sensibles à cet antibiotique, étant inhibées par des concentrations oscillant entre 0,0010 U.I./ml et 0,0625 U.I./ml. La majorité des souches présentent une sensibilité variant entre 0,0078 U.I./ml et 0,0312 U.I./ml, la fréquence maximum étant située à 0,0156 U.I./ml. Les valeurs respectives présentent une distribution normale de la fréquence, se soumettant à la loi de Gauss, fait qu'on peut observer aussi dans le cas de la pénicillinase.

Poursuivant les relations qui existent entre les deux caractères, on constate une variation indépendante de ces caractères, ce qui indique l'absence de liaison

entre eux et nous oblige à conclure que les degrés variés de la sensibilité à la pénicilline des souches de *B. anthracis* ne dépendent pas des différences quantitatives dans l'élaboration de la pénicillinase.

*Tableau I*

**Relations entre la production de la pénicillinase et la sensibilité à la pénicilline de différentes souches de *B. anthracis***

| | | | Nombre de souches sensibles aux concentrations de pénicilline indiquées | | | | | | | Total souches |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Concentration de la pénicilline (U.I./ml) | | | | | | | |
| | | | 0,0625 | 0,0312 | 0,0156 | 0,0078 | 0,0039 | 0,0020 | 0,0010 | |
| Nombre des souches élaborant les concentrations indiquées de pénicillinase | Titre de la pénicillinase élaborée *) | 6,25 | | | | 1 | | | | 1 |
| | | 12,5 | | | | | | | | |
| | | 25 | | 1 | | 1 | 2 | | | 4 |
| | | 50 | | | | 1 | 1 | | | 2 |
| | | 100 | | | 3 | 1 | 2 | | 1 | 7 |
| | | 200 | 1 | 2 | 12 | 4 | 1 | | | 20 |
| | | 400 | 1 | 15 | 21 | 11 | 4 | 2 | 1 | 55 |
| | | 800 | 1 | | 17 | 4 | 1 | | | 23 |
| | | 1600 | 1 | 2 | | | | | | 3 |
| Total souches | | | 4 | 20 | 53 | 23 | 11 | 2 | 2 | 115 |

*) Le titre de la pénicillinase a été exprimé par le nombre des unités de pénicilline détruites par 1 ml de préparation dans l'intervalle d'une heure à 37°C. Pour des quantités d'enzyme inferieures à 100 U le titrage a été effectué par la méthode Iland et Baines et pour celles dépassant 100 U par la méthode Markov, Bardarov, Popov.

Les résultats obtenus par nous dans le cas du *B. anthracis*, confirmant ceux des autres auteurs qui ont travaillé avec des bactéries différentes, ainsi que l'absence de sécrétion de pénicillinase chez une série de germes naturellement résistants à la pénicilline, soulignent le fait que la production de la pénicillinase ne représente pas en général le facteur qui détermine la résistance des germes à des doses thérapeutiques de pénicilline. Le staphylocoque se singularise de ce point de vue, mais seulement en partie, car la pénicillino-résistance acquise « in vitro » n'est pas accompagée par l'élaboration de pénicillinase. Par conséquent, le parallélisme entre ces 2 caractères observé chez les souches de staphylocoques isolées des malades paraîtrait inexplicable si on le considère par le prisme des résultats obtenus avec d'autres germes, supposant que nous ne sommes pas en présence de simples coïncidences.

Ces données ont infirmé l'idée que la découverte de la pénicillinase pourrait élucider le problème du mécanisme de la résistance à la pénicilline.

Quel serait en ce cas le rôle de la pénicillinase, vu les faits discutés ?. Deux hypothèses pourraient être invoquées.

La première hypothèse a comme point de départ la supposition que la pénicillinase pourrait jouer dans le métabolisme des germes aussi un autre rôle que celui de destructeur de la pénicilline.

La seconde hypothèse se fonde sur la supposition que la sécrétion de la pénicillinase serait un moyen de défense des bactéries, se trouvant en conditions naturelles, contre les quantités très réduites de pénicilline élaborées par les champignons, tandis que la résistance envers les fortes concentrations thérapeutiques d'antibiotiques, serait due à un mécanisme différent. Les doses réduites de pénicilline pouvant se rencontrer en conditions naturelles permettraient la séléction des cellules bactériennes productrices de pénicillinase d'une population très sensible à cet antibiotique, tel le *B.anthracis*, alors que ces doses restent inactives en présence d'espèces moins sensibles.

Il va de soi que les faits exposés sont des simples hypothèses, leur vérification expérimentale s'imposant; un résultat positif éluciderait un problème qui abonde en contradictions.

## CONCLUSIONS.

1. On a étudié l'élaboration de la pénicillinase par 115 souches de *B. anthracis* récemment isolées de l'homme et d'animaux, constatant que ces souches sécrètent une pénicillinase extracellulaire, constitutive, non-influencée par l'addition de la pénicilline au milieu. La pénicillinase a été obtenue par agitation de la culture en bouillon simple pendant 3 jours à 37°C.

2. Le titre maximum obtenu a été de 1600 U pénicillinase/ml (3 souches), le titre minimum — 6,25 U/ml (1 souche), le titre le plus fréquemment obtenu (55 souches) étant de 400 U/ml.

3. On a étudié la sensibilité à la pénicilline de 115 souches de *B. anthracis* par la méthode des dilutions.

Toutes les souches ont été sensibles à la pénicilline. La sensibilité a varié entre 0,0625 U.I. pénicilline/ml (4 souches) et 0,0010 U.I/ml (2 souches), la plupart de souches étant sensibles à 0,0156 U.I./ml (53 souches).

4. On n'a observé aucune relation entre l'élaboration de la pénicillinase et la sensibilité à la pénicilline des souches de *B. anthracis*, les deux caractères variant de manière indépendante. Il ressort que les différents degrés de sensibilité à la pénicilline des souches de *B. anthracis* ne peuvent s'expliquer par l'élaboration de quantités différentes de pénicillinase.

5. On discute les explications possibles de cette absence de corrélation, en émettant plusieurs hypothèses dont la vérification expérimentale doit suivre.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Abraham E. P. et Chain E. — Nature (Lond.), 1940, **146**, 837.
2. Bondi A. et Dietz C. C. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1944, **56**, 132.
3. Bondi A. et Dietz C. C. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1944, **56**, 135.
4. Bondi A. et Dietz C. C. — J. Bact., 1944, **47**, 426.
5. Bondi A. et Dietz C. C. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1945, **60**, 55.
6. Geronimus L. H. et Cohen S. — J. Bact., 1957, **75**, 28.
7. Iland C. N. et Baines S. — J. Path. Bact., 1949, **61**, 329.
8. Markov V., Bardarov S. et Popov E. — Jurn. Mikrobiol. Epidemiol. i Immununobiol., 1955, nr. 5, 76.

9. Sasarman A., Horodniceanu Th., Krantzdorf H. et Tulpan, G. — Micr. Parazit. Epid., 1956, nr. 6,513.
10. Spink W. W., Ferris V. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1945, **59**, 188.
11. Teodorovici G. et Zingher S. — Micr. Parazit. Epid., 1958, **5**, 395.

## К ИЗУЧЕНИЮ БАКТЕРИЙНЫХ ПЕНИЦИЛЛИНАЗ

### СООБЩЕНИЕ III-Е. ОТНОШЕНИЕ МЕЖДУ ВЫРАБАТЫВАНИЕМ ПЕНИЦИЛЛИНАЗЫ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ К ПЕНИЦИЛЛИНУ ШТАММОВ СИБИРЕЯЗВЕННОЙ ПАЛОЧКИ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

1. Изучали вырабатывание пенициллиназы у 115 штаммов сибиреязвенной палочки, недавно выделенных у людей и животных; установлено наличие у данных штаммов внеклеточной, составной (конститутивной) пенициллиназы, не находящейся под влиянием добавления пенициллина к питательной среде. Пенициллиназа получена путем встряхивания в течении 3 дней при 37°, культур, выращенных на простом бульоне.

2. Среди полученных титров максимальный равнялся 1600 Е пенициллиназы/мл (3 штамма), минимальный титр — 6,25 Е/мл (1 штамм); у большей части штаммов (55 штаммов) титр равнялся 400 Е/мл.

3. Чувствительность 115 штаммов сибиреязвенной палочки по отношению к пенициллину изучалась с применением способа последовательных разведений.

Все изучаемые штаммы оказались чувствительными к пенициллину. Чувствительность штаммов колебалась между 0,0625 ИЕ пенициллина/мл (4 штамма) и 0,0010 ИЕ/мл (2 штамма) причем большинство штаммов (53 штамма) были чувствительными к 0,0156 ИЕ/мл.

4. Не отмечено наличие какой либо связи между образованием пенициллиназы и чувствительности к пенициллину штаммов сибиреязвенной палочки; между изменчивостью вышеуказанных свойств не отмечается никакой связи. Таким образом, разная степень чувствительности к пенициллину штаммов сибиреязвенной палочки — не объясняется вырабатыванием пенициллиназы в разных количествах.

5. Обсуждаются возможные объяснения отсутствия корреляции вышеуказанных признаков и выдвигаются несколько гипотез, экспериментальную проверку которых надлежит провести в дальнейшем.

## BEITRÄGE ZUM STUDIUM DER BAKTERIENPENIZILLINASEN

### III. MITTEILUNG. DIE BEZIEHUNG ZWISCHEN PENIZILLINASEBILDUNG UND PENIZILLINEMPFINDLICHKEIT BEI ANTHRAXBAZILLENSTÄMMEN

ZUSAMMENFASSUNG

1. Bei 115 Stämmen von *B. anthracis* wurde die Penizillinasebildung kurz nach der Isolierung von Menschen oder Tieren untersucht und festgestellt, dass diese Stämme eine konstitutionelle, extrazelluläre Penizillinase besitzen, die durch Penizillinzusatz zum Nährboden nicht beeinflusst wird. Die Penizillinase wurde durch dreitägiges Schütteln der Kulturen in einfacher Nährbouillon bei 37°C gewonnen.

2. Der höchste erhaltene Penizillinasetiter betrug 1600 E/ml (3 Stämme) und der niedrigste 6,25 E/ml (1 Stamm), während sich bei den meisten Stämmen (55) der Titer auf 400 E/ml belief.

3. Die Penizillinempfindlichkeit wurde bei 115 Anthraxbazillenstämmen mit Hilfe des Verdünnungsverfahrens bestimmt.

Alle untersuchten Stämme waren penizillinempfindlich. Die Penizillinempfindlichkeit schwankte von 0,0625 IE/ml (4 Stämme) bis 0,0010 IE/ml (2 Stämme) und betrug bei den meisten Stämmen (53) 0,0156 IE/ml.

4. Zwischen der Penizillinasebildung und der Penizillinempfindlichkeit der Anthraxbazillenstämme konnte kein Zusammenhang festgestellt werden. Diese beiden Merkmale variieren unabhängig voneinander. Daher können die verschiedenen Grade der Penizillinempfindlichkeit bei Anthraxbazillenstämmen nicht auf die Bildung verschiedener Penizillinasemengen zurückgeführt werden.

5. Die für die Erklärung dieses Mangels an Korrelation in Frage kommenden Möglichkeiten werden erörtert und mehrere Hypothesen formuliert, deren experimentelle Nachprüfung, in der Zukunft durchzuführen bleibt.

## CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF BACTERIAL PENICILLINASES

### NOTE III. RELATIONSHIPS BETWEEN PENICILLINASE PRODUCTION AND SUSCEPTIBILITY TO PENICILLIN IN *B. ANTHRACIS* STRAINS

SUMMARY

1. Penicillinase production was investigated in 115 strains of *B. anthracis* recently isolated from humans and animals. These strains were found to possess a constitutive, extracellular penicillinase which is not influenced by the addition of penicillin to the culture medium. Penicillinase was obtained by shaking simple broth cultures for 3 days at 37°C.

2. The highest penicillinase titre recorded was 1600 U/ml (3 strains), the lowest 6.25 U/ml. (1 strain), and the titre in most of the strains (55) amounted to 400 U/ml.

3. Susceptibility to penicillin was investigated by the dilution method in 115 strains of *B. anthracis*.

All the strains tested were susceptible to penicillin. Susceptibility to the antibiotic ranged from 0.0625 IU/ml. (4 strains) to 0.0010 IU/ml. (2 strains), most of the strains (53) being susceptible to. 0.0156 IU/ml.

4. The relationship whatever was found to exist between penicillinase production and susceptibility to penicillin in these strains of *B. anthracis*, the two characters varying independently of each other. Hence, the various degrees of susceptibility to penicillin in *B. anthracis* strains cannot be accounted for by the production of different amounts of penicillinase.

5. The possible explanations of this lack of correlation are discussed and several hypotheses are made whose experimental testing remains to be carried out in the future.

# RECHERCHES «IN VITRO» CONCERNANT L'ACTION DES ASSOCIATIONS D'ANTIBIOTIQUES SUR LES ANAÉROBIES DU GENRE *CLOSTRIDIUM*

(COMMUNICATION PRÉLIMINAIRE *)

par

J. Bittner, S. Antohi et Viorica Voinesco

*(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service des Anaérobies)*

— Manuscrit reçu le 26 juillet 1960 —

Dans un travail antérieur (1) nous avons exposé les résultats obtenus par l'étude de la sensibilité de 62 souches de germes appartenant au genre *Clostridium* vis-à-vis de 17 antibiotiques et 2 sulfamides.

L'étude de l'action des antibiotiques associés sur les germes aérobies s'est largement répandue ces dernières années; néanmoins, les résultats sont loin d'être concluants, dépendant des antibiotiques et de la dose employée, ainsi que de la méthode, de l'espèce microbienne et même de la souche utilisées.

Dans la littérature que nous avons eue à notre disposition nous n'avons trouvé qu'une seule étude concernant l'effet des associations d'antibiotiques sur les anaérobies du genre *Clostridium*, les auteurs appliquant la méthode des dilutions en milieu liquide (2).

La présente note représente un premier essai en vue d'étudier l'effet des associations d'antibiotiques sur certains germes anaérobies du genre *Clostridium*, par une méthode simple de diffusion en gélose.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

La technique utilisée a été exposée dans notre communication antérieure (1). Dans le présent travail nous avons employé des dilutions d'antibiotiques associés deux par deux. En notant par A et B deux antibiotiques utilisés dans les mêmes dilutions que celles employées pour l'imprégnation des rondelles dans le travail antérieur (1 U.I. pénicilline, 2 U. bacitracine et par 5 $\gamma$ des autres antibiotiques), les mélanges étaient faits de manière que les rondelles contiennent:

| | | |
|---|---|---|
| 0,25 A + 0,25 B | | |
| 0,5 A + 0,5 B | 1,0 A + 0,5 B | 1,0 A + 2,5 B |
| 0,5 A + 1,0 B | 2,5 A + 0,5 B | 1,0 A + 5,0 B |
| 0,5 A + 2,5 B | 5,0 A + 0,5 B | 2,5 A + 1,0 B |
| 0,5 A + 5,0 B | 1,0 A + 1,0 B | 5,0 A + 1,0 B |

*) Communication présentée au Symposium: „Les indications et les limites de la chimiothérapie antiinfectieuse", qui a eu lieu du 14 au 17 décembre 1960, à Bucarest.

Les antibiotiques étudiés ont été la pénicilline, l'auréomycine, le chloramphénicol, la streptomycine et la bacitracine, associés par groupes de deux, dans toutes les combinaisons possibles. Ainsi, pour l'étude de chaque souche on a déterminé l'action de 130 combinaisons d'antibiotiques.

Pour chaque détermination d'antibiotiques en association on a employé comme témoins les mêmes dilutions d'antibiotiques, mais testés séparément.

On a testé 8 souches appartenant à 7 espèces clostridiennes, et notamment 2 souches de *Cl. perfringens* type A: la souche de collection B.P.$_6$K. et la souche « *Catinca* », isolée d'un cas mortel de septicémie post-abortum et par une souche de *Cl. oedematiens* (No. 277), *Cl. tetani* (No. 21), *Cl. septicum* (No. 59), *Cl. histolyticum* (No. 5), *Cl. sporogenes* et *Cl. bifermentans*; en total on a exécuté plus de 1000 déterminations.

Toutes les autres conditions de travail, de même que le milieu de culture employé, ont été exposés dans la communication précédente (1).

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats obtenus sont présentés schématiquement dans le tableau I, montrant pour chaque souche testée et pour chacune des 10 associations d'antibiotiques l'incidence de la synergie, de l'antagonisme ou de l'indifférence pour les 13 combinaisons quantitatives.

Nous avons considéré comme indice de la synergie la zone dont le diamètre dépassait de plus de 20% et comme indice de l'antagonisme un diamètre de moins de 20% que le diamètre obtenu en testant séparément l'antibiotique le plus actif de l'association. Les résultats s'encadrant entre + 20% et — 20% ont été considérés comme indifférents.

Peyré et Velu (3), critiquant la méthode de la diffusion en gélose appliquée à l'étude de l'association des antibiotiques, ont soutenu que la synergie ne peut apparaître qu'en cas d'association d'antibiotiques avec zones de diffusion similaires; dans le cas contraire ce n'est que l'antibiotique le plus diffusible qui est mis en valeur. Selon nos observations, il n'existe pas de relation entre l'incidence des cas de synergie et la capacité de diffusion ou la proportion d'antibiotiques employée dans l'association; de même, nous considérons que les dimensions des zones d'antagonisme ne sont pas strictement proportionnelles au pouvoir de diffusion des antibiotiques.

Le pourcentage général constaté dans toutes les déterminations a été de 69,2% — combinaisons indifférentes, 25,3% — associations synergiques et 5,5% — associations antagonistes.

Nous avons observé un comportement varié des différentes espèces microbiennes testées envers les mêmes associations d'antibiotiques; toutefois les deux souches de *Cl. perfringens* donnent, dans 7 des 10 associations, une configuration plus ou moins égale des indices d'antibiose.

Nous attirons l'attention sur le pourcentage élevé de combinaisons synergiques observées dans les suivantes associations:

— pénicilline + chloramphénicol, pénicilline + bacitracine — pour le *Cl. perfringens ;*

— auréomycine + chloramphénicol, streptomycine + bacitracine — pour le *Cl. histolyticum ;*

*Tableau I*

**L'effet de différentes combinaisons d'antibiotiques sur différentes espèces du genre Clostridium**

| Antibiotiques associés | Espèces étudiées | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Cl. perfringens B.P.$_6$K. | | | Cl. perfringens Catinca | | | Cl. histolyticum no. 5 | | | Cl. oedematiens no. 277 | | | Cl. tetani no. 21 | | | Cl. septicum no. 59 | | | Cl. sporogenes | | | Cl. bifermentans | | |
| | Nombre de combinaisons à effet | | | Nombre de combinaisons à effet | | | Nombre de combinaisons à effet | | | Nombre de combinaisons à effet | | | Nombre de combinaisons à effet | | | Nombre de combinaisons à effet | | | Nombre de combinaisons à effet | | | Nombre de combinaisons à effet | | |
| | S*) | A | I | S | A | I | S | A | I | S | A | I | S | A | I | S | A | I | S | A | I | S | A | I |
| P + A | 1 | — | 12 | 1 | — | 12 | 2 | 5 | 6 | 2 | 6 | 5 | 2 | 4 | 7 | 4 | 1 | 8 | 1 | 6 | 6 | — | — | 13 |
| P + Cl | 8 | — | 5 | 8 | — | 5 | 4 | — | 9 | 4 | 1 | 8 | 4 | — | 9 | 1 | — | 12 | 4 | 2 | 7 | 6 | — | 7 |
| P + S | 4 | — | 9 | — | — | 13 | 4 | 3 | 6 | 4 | — | 9 | — | — | 13 | 1 | 4 | 8 | 2 | 1 | 10 | — | 1 | 12 |
| P + Ba | 11 | — | 2 | 8 | — | 5 | 3 | — | 10 | 1 | — | 12 | 3 | — | 10 | 1 | 1 | 11 | 4 | — | 9 | 3 | — | 10 |
| A + Cl | 5 | — | 8 | 9 | — | 4 | 8 | — | 5 | 2 | 1 | 10 | — | 5 | 8 | 5 | — | 8 | 1 | — | 12 | 2 | — | 11 |
| A + S | — | — | 13 | 9 | — | 4 | 9 | — | 4 | 1 | — | 12 | 3 | — | 10 | — | — | 13 | 1 | 1 | 11 | — | — | 13 |
| A + Ba | 1 | — | 12 | 5 | — | 8 | 10 | — | 3 | 1 | — | 12 | 3 | — | 10 | 6 | — | 7 | — | — | 13 | — | — | 13 |
| S + Cl | 1 | — | 12 | 9 | — | 4 | 3 | — | 10 | 4 | — | 9 | 4 | 2 | 7 | 1 | 3 | 9 | 8 | — | 5 | — | — | 13 |
| Cl + Ba | 1 | — | 12 | 3 | — | 10 | 6 | — | 7 | — | 2 | 11 | 7 | 1 | 5 | 4 | — | 9 | 11 | — | 2 | — | 1 | 12 |
| S + Ba | — | — | 13 | — | — | 13 | 1 | — | 12 | — | 5 | 8 | 3 | — | 10 | 7 | — | 6 | 9 | 1 | 3 | — | 1 | 12 |
| Total combinaisons par souche | 32 | — | 98 | 52 | — | 78 | 50 | 8 | 72 | 19 | 15 | 96 | 29 | 12 | 89 | 30 | 9 | 91 | 41 | 11 | 78 | 11 | 3 | 116 |

Légende: P = pénicilline; A = auréomycine; Cl = chloramphénicol;
S = streptomycine; Ba = bacitracine;
Observation: *) S = synergie; A = antagonisme; I = indifférence.

— streptomycine + chloramphénicol, streptomycine + bacitracine, chloramphénicol + bacitracine — pour le *Cl. sporogenes ;*

— chloramphénicol + bacitracine — pour le *Cl. tetani ;*

— streptomycine + bacitracine — pour le *Cl. septicum.*

Il résulte donc de ces données que, dans l'ensemble, le chloramphénicol et la bacitracine ont donné le plus grand pourcentage de combinaisons synergiques.

Comparant le tableau I avec les données de notre travail antérieur (1), il s'ensuit que le nombre total de combinaisons antagonistes pour les différentes souches, diminue dans le même ordre que la sensibilité aux antibiotiques de ces souches. Ce phénomène s'observe le plus nettement chez l'espèce la plus sensible — le *Cl. oedematiens* — qui donne 15 combinaisons antagonistes et 19 synergiques et chez l'espèce la moins sensible — le *Cl. perfringens* — qui ne présente aucune combinaison antagoniste et 32—52 combinaisons synergiques.

Il résulterait donc que l'association est peu favorable aux souches très sensibles aux antibiotiques, donnant un pourcentage plus élevé de combinaisons antagonistes et, par contre, favorable aux souches peu sensibles, chez lesquelles le pourcentage d'associations antagonistes approche de zéro.

Le fait que l'association a une action salutaire sur les espèces moins sensibles en général, présente une éventuelle importance clinique, car c'est justement vis-à-vis de ces espèces et surtout du *Cl. perfringens* (l'espèce la plus fréquemment rencontrée dans la clinique) que le traitement aux antibiotiques associés serait le plus indiqué.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bittner J., Voinesco V. et Antohi S. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1961, **20**, 63.
2. Eveland W.C., Newton A. Pohutsky E.R., Purdy D.S. et Frick L.P. — Antibiot. a. Chemotherap., 1955, **5**, 470.
3. Peyré M. et Velu H. — Revue d'Immunol., 1952, **16**, 142.

## ИССЛЕДОВАНИЯ «in vitro» ДЕЙСТВИЯ АССОЦИАЦИЙ АНТИБИОТИКОВ НА АНАЭРОБОВ РОДА *CLOSTRIDIUM*

(ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЕ СООБЩЕНИЕ)

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

1. Изучали чувствительность 8 штаммов клостридиев, а именно: 2 штамма *Cl. perfringens* (один музейный и один выделенный из смертельного поставортного сепсиса) и по одному штамму *Cl. oedematiens, Cl. tetani, Cl. histolyticum. Cl. septicum Cl. sporogenes, Cl. bifermentans* по отношению к ассоциациям пенициллина, ауреомицина, хлорамфеникола, бацитрацина и стрептомицина взятых по два во всех возможных сочетаниях и в 13 разных количественных соотношениях.

Применяли простую методику диффузии в агаре, описанную в предыдущем сообщении, причем проведены свыше 1000 исследований.

За усиление или за угнетение действия 2 одновременно испытываемых антибиотиков считалось получение зоны угнетения с диаметром на 20% больше или меньше чем диаметр полученный с наиболее сильным антибиотиком из пары, испытанным отдельно; другие результаты считались индиферентными сочетаниями.

2. В общем 69,2% сочетаний были индиферентными 5,5% — угнетающими и 25,3% усиляющими.

3. Формула реакций 2-х штаммов одного-же вида, *(Cl. perfringens)* более или менее похожа для 7 из 10 пар антибиотиков.

4. Реакция различна у разных видов. Наиболее благоприятными явились ассоциации пенициллина с хлорамфениколем или с бацитрацином для *Cl. perfringens*, ауреомицина с хлорамфениколем, стрептомицином или бацитрацином для *Cl. histolyticum*, стрептомицина с хлорамфениколем или бацитрацином и хлорамфениколя с бацитрацином для *Cl. sporogenes*, хлорамфениколя с бацитрацином для *Cl. tetani* и стрептомицина с бацитрацином для *Cl. septicum*. В общем бацитрацин и хлорамфениколь дали самый большой процент усиляющих сочетаний.

5. Вообще насколько штамм более чувствителен ко всем антибиотикам испытанным отдельно, настолько ассоциация штаммов дает наибольший процент угнетающих ассоциаций.

Так среди 130 сочетаний, наиболее чувствительный вид — *Cl. oedematiens* дает 15 угнетающих и 19 усиляющих, а наименее чувствительный вид — *Cl. perfringens* не дает ни одного угнетающего сочетания и 32—52 усиляющих.

Установленные данные имеют возможно значение в клинике, в особенности при лечении сочетаниями антибиотиков инфекций с *Cl. perfringens*, встречающихся довольно часто.

## UNTERSUCHUNGEN « IN VITRO » ÜBER DIE WIRKUNG DER ASSOZIATION VON ANTIBIOTIKA AUF DIE ANAEROBEN DER GATTUNG *CLOSTRIDIUM*.

(VORLÄUFIGE MITTEILUNG)

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Empfindlichkeit von *Clostridium* Stämmen (2 Stämme von *Cl. perfringens*, einer davon aus der Sammlung und ein von einem Fall tödlicher Septikämie *post abortum* isolierter Stamm, je ein Stamm von *Cl. oedematiens*, *Cl. tetani*, *Cl. histolyticum*, *Cl. septicum*, *Cl. sporogenes* und *Cl. bifermentans)* für die Assoziation von Penizillin, Aureomyzin, Chloramphenikol, Bazitrazin und Streptomyzin in allen möglichen Zweierkombinationen und in 13 verschiedenen Mengenverhältnissen, wurde einer Prüfung unterzogen.

Angewendet wurde das in einer früheren Arbeit beschriebene einfache Verfahren der Diffusion in Agar. Insgesamt wurden über 1000 Bestimmungen durchgeführt.

Als Verstärkung oder Abschwächung der Wirksamkeit der beiden gemeinsam geprüften Antibiotika wurde die Bildung einer um 20% (Durchmesser) grösseren bezw. kleineren Inhibitionszone als im Falle der Verwendung des wirksamsten Antibiotikums des Paares angesehen. Kombinationen, die geringere Unterschiede ergaben, wurden als indifferent betrachtet.

2. Insgesamt waren 69,2% Kombinationen indifferent, 5,5% abschwächend und 25,3% verstärkend.

3. Das Schema des Ansprechens auf 7 der 10 Paare von Antibiotika war bei Stämmen derselben Art *(perfringens)* mehr oder weniger gleich.

4. Das Ergebnis ist je nach der Art verschieden. Die günstigsten Kombinationen waren Penizillin und Chloramphenikol oder Bazitrazin bei *Cl. perfringens*, Aureomyzin und Chloramphenikol, Streptomyzin oder Bazitrazin bei *Cl. histolyticum;* Streptomyzin und Chloramphenikol oder Bazitrazin sowie Chloramphenikol und Bazitrazin bei *Cl. sporogenes;* Chloramphenikol und Bazitrazin bei *Cl. tetani;* Streptomyzin und Bazitrazin bei *Cl. septicum*. Im grossen ganzen ergaben Bazitrazin und Chloramphenikol den höchsten Prozentsatz verstärkender Kombinationen.

5. Im allgemeinen ergibt bei einer bestimmten Art die Assoziation der Antibiotika einen um so grösseren Prozentsatz abschwächender Kombinationen, als die betreffende Art für die einzeln geprüften Antibiotika empfindlicher ist.

So sind bei der empfindlichsten Art — *Cl. oedematiens* — von 130 Kombinationen 15 abschwächend und 19 verstärkend, während bei der am wenigsten empfindlichen Art — *Cl. perfringens* — keine einzige Kombination abschwächend und 32—52 verstärkend sind.

Diese Feststellung konnte in der Klinik von Bedeutung sein, insbesondere bei der Behandlung der verhältnismässig häufigen *Cl. perfringens* Infektionen mit kombinierten Antibiotika.

## « IN VITRO » INVESTIGATIONS CONCERNING THE ACTION OF ANTIBIOTIC ASSOCIATIONS ON THE ANAEROBES OF THE *CLOSTRIDIUM* GENUS

(PRELIMINARY COMMUNICATION)

SUMMARY

1. The susceptibility of 8 strains of *Clostridia*, i.e. 2 strains of *Cl. perfringens* (one from the collection and one isolated from a case of lethal septicaemia *post abortum*) and one strain each of *Cl. oedematiens*, *Cl. tetani*, *Cl. histolyticum*, *Cl. septicum*, *Cl. sporogenes* and *Cl. bifermentans*, to antibiotic associations was investigated. The antibiotics used were penicillin, aureomycin, chloramphenicol, bacitracin and streptomycin taken in all possible combinations of 2 and in 13 different quantitative ratios.

On the whole, over 1000 determinations were performed by means of the simple agar diffusion method described in a previous paper.

Enhancement or inhibition of the two antibiotics tested together was considered to have occurred if the diameter of the inhibition zones differed by + or — 20 per cent from the diameter of the zone caused by the stronger antibiotic of the pair when tested separately. Other results were considered as indicating indifferent combinations.

2. On the whole, there were 69.2 per cent indifferent, 5.5 per cent inhibiting, and 25.3 enhancing combinations.

3. The patterns of response to 7 of 10 pairs of antibiotics were approximately the same in two strains of the same species *(Cl. perfringens)*.

4. The response varies according to the species. The most favourable associations were: penicillin with chloramphenicol or bacitracin for *Cl. perfringens*; aureomycin with chloramphenicol, streptomycin, or bacitracin for *Cl. histolyticum;* streptomycin with chloramphenicol or bacitracin, and chloramphenicol with bacitracin for *Cl. sporogenes;* chloramphenicol with bacitracin for *Cl. tetani* and streptomycin with bacitracin for *Cl. septicum*. On the whole, bacitracin and chloramphenicol yielded the highest percentage rates of enhancing combinations.

5. As a rule, the more susceptible a species is on the whole to the separately tested antibiotics, the higher is the percentage rate of inhibiting combinations of the latter.

Thus, out of 130 combinations, 15 are inhibiting and 19 enhancing for the most susceptible species *(Cl. oedematiens)*, while none is inhibiting and 32—52 are enhancing for the least susceptible one *(Cl. perfringens)*.

This finding may be of some clinical consequence, in particular in connexion with the treatment of *Cl. perfringens* infections (which are not uncommon) by means of antibiotic associations.

# LE DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE SÉRO-ALLERGIQUE COMPLEXE DE LA COQUELUCHE

par

IRINA SOARE, MARIA GOLĂESCO et ARETY SCURTU

*(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service de B. pertussis)*

— Manuscrit reçu le 18 avril 1960 —

Dans une étude antérieure (14) nous avons analysé la valeur du diagnostic complexe de la coqueluche par l'association de plusieurs méthodes de diagnostic (examen bactériologique, examen sérologique, détermination de l'indice opsono-cytophagique (IOC) et leucogramme).

Les résultats de ces analyses ont démontré qu'elles concordent en grande mesure et que les données se complètent réciproquement, ce qui permet de poser le diagnostic de la coqueluche dans une proportion plus élevée que celle obtenue par une seule méthode.

Dans la présente étude, nous nous sommes proposé d'examiner la corrélation entre la réaction cutanée donnée par le polysaccharide extrait de la *B. pertussis* (10) et les autres méthodes de diagnostic, dans le but de vérifier la concordance des résultats et à quel point les données se complètent, afin d'obtenir le diagnostic le plus complexe bactériologique-séro-allergique de la coqueluche.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nos observations ont porté sur environ 190 enfants malades et suspects de coqueluche internés à l'hôpital Colentina, service de Maladies contagieuses, ou admis à la crèche « Zorile Viitorului » et autres collectivités d'enfants. Nous avons poursuivi le parallélisme existant entre la réaction cutanée (allergène) l'examen bactériologique, l'IOC, la réaction d'agglutination et le leucogramme. Les prélèvements ont été faits soit simultanément, le même jour, soit dans un délai de 24—48 heures.

Les techniques utilisées on été décrites dans nos travaux antérieurs (10, 11, 12, 13).

## RÉSULTATS

*Corrélation entre le test intradermique et l'indice opsono-cytophagique.* L'étude parallèle de la réaction cutanée (IDR) et celle de l'IOC, par rapport à la période de maladie (Tableau I), nous a permis de constater que seulement 7,1% des enfants examinés au cours de la première semaine ont eu les deux réactions positives, la majorité (57,1%) présentant la réaction cutanée négative, en même temps

*Tableau I*

**Corrélation entre la réaction cutanée (I.D.R.) et la réaction d'agglutination (A), l'indice opsono-cytophagique (I.O.C.) et le leucogramme (L) par rapport à la période de maladie (coqueluche).**

| Corrélation entre les réactions | RÉACTION | I-e sem. | | II-e sem. | | III-e sem. | | IV-e sem. | | Après 4 sem. | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | IDR. IOC. A. L. | Nombre enf. | % | Nombre enf. | % | Nombre enf. | % | Nombre enf. | % | Nombre enf. | % |
| I.D.R + IOC | + + | 1/14 | 7,1 | 3/6 | 50 | 4/4 | 100 | 3/4 | 75 | 4/12 | 33,3 |
| | + − | 3/14 | 21,4 | 2/6 | 33,5 | | | | | 2/12 | 16,6 |
| | − + | 8/14 | 57,1 | | | | | 1/4 | 25 | 5/12 | 41,6 |
| | − − | 2/14 | 14,2 | 1/6 | 16,6 | | | | | 1/12 | 7,5 |
| | Total enf. 40 | 14 | | 6 | | 4 | | 4 | | 12 | |
| I.D.R. + A | + + | 1/4 | 25 | 4/8 | 50 | 6/11 | 54,5 | 2/2 | 100 | 2/5 | 40 |
| | + − | | | | | 1/11 | 9,99 | | | | |
| | − + | 2/4 | 50 | 4/8 | 50 | 2/11 | 18,1 | | | 2/5 | 40 |
| | − − | 1/4 | 25 | | | 2/11 | 18,1 | | | 1/5 | 20 |
| | Total enf. 30 | 4 | | 8 | | 11 | | 2 | | 5 | |
| I.D.R. + IOC + A | + + + | | | | | 1/1 | 100 | 1/2 | 50 | 2/7 | 28,5 |
| | + − + | | | 2/2 | 100 | | | | | | |
| | + − − | 1/3 | 33,3 | | | | | | | 2/7 | 28,5 |
| | − + − | | | | | | | 1/2 | 50 | 1/7 | 14,1 |
| | − + + | 1/3 | 33,3 | | | | | | | 1/7 | 14,1 |
| | − − − | 1/3 | 33,3 | | | | | | | 1/7 | 14,1 |
| | Total enf. 15 | 3 | | 2 | | 1 | | 2 | | 7 | |
| I.D.R. + IOC + A + L | + − + + | | | 3/4 | 75 | 5/6 | 83,3 | 3/4 | 75 | 1/2 | 50 |
| | − + + | | | | | 1/6 | 16,6 | 1/4 | 25 | 1/2 | 50 |
| | − + − | 1/1 | 100 | | | | | | | | |
| | + + − | | | 1/4 | 25 | | | | | | |
| | Total enf. 17 | 1 | | 4 | | 6 | | 4 | | 2 | |
| I.D.R. + L | + + | 1/4 | 25 | 3/14 | 21,4 | 5/9 | 55,5 | 4/5 | 80 | 2/9 | 22,2 |
| | + − | | | 3/14 | 21,4 | | | | | 1/9 | 11,1 |
| | − + | 2/4 | 50 | 8/14 | 57,1 | 3/9 | 33,3 | 1/5 | 20 | 5/9 | 55,5 |
| | − − | 1/4 | 25 | | | 1/9 | 11,1 | | | 1/9 | 11,1 |
| | Total enf. 41 | 4 | | 14 | | 9 | | 5 | | 9 | |

que l'IOC positif. La seconde semaine les réactions parallèlement positives ont atteint 50% des cas pour arriver à 100% la troisième et quatrième semaine; après un mois le pourcentage des réactions positives tombe à 33,33%, alors que le nombre des réactions discordantes a été trouvé chez 41,6% des enfants (IOC positif, IDR négative).

Donc, pendant la première et la quatrième semaine de maladie, l'IOC a été trouvé positif plus souvent que l'IDR, ce qui confirme nos observations antérieures sur la valeur diagnostique de la réaction cutanée par le polysaccharide extrait de la *B. pertussis* et celle de la réaction de l'indice opsono-cytophagique, poursuivies séparément; à cette occasion nous avons constaté que l'IOC est une réaction très précoce.

En conclusion, l'étude simultanée des deux réactions a prouvé qu'après la première semaine de maladie l'IDR et l'IOC concordent en grande partie, que le maximum de réactions parallèlement positives s'observe pendant la troisième et la quatrième semaine et que les données se complètent réciproquement, aidant au diagnostic de la coqueluche.

*Corrélation entre le test cutané et les agglutinines.* En poursuivant simultanément le test cutané avec allergène et celui d'agglutination (A), rapportés à la période de maladie, nous avons constaté:

La première semaine, 25% des enfants ont présenté les deux réactions positives; les semaines suivantes, le nombre des réactions positives augmente pour atteindre 100% dans la quatrième semaine.

Les examens effectués après 4 semaines ont montré une diminution des réactions parallèlement positives jusqu'à 40%; les autres enfants (40%) ont présenté des réactions non-concordantes (réaction d'agglutination positive associée à l'IDR négative — Tableau I).

L'étude des réactions par IDR et A prouve que ces deux réactions évoluent parallèlement à l'exception de la première et cinquième semaine, lorsque la réaction d'agglutination est plus fréquemment positive que l'IDR; il en résulte donc que la réaction d'agglutination est une méthode de diagnostic plus précoce et qui reste positive plus longtemps que l'IDR.

*Corrélation entre la réaction cutanée et le leucogramme.* De l'analyse du tableau I, 3-e colonne, il ressort également que le nombre le plus élevé (80%) de réactions simultanément positives a été atteint au cours de la 4-e semaine.

*Étude de la valeur du diagnostic bactériologique-séro-allergique complexe.* La corrélation entre le diagnostic bactériologique, la présence des agglutinines, la détermination de l'IOC, la réaction intra-dermique et le leucogramme, a été poursuivie sur 40 enfants malades, suspects de coqueluche. Des données obtenues par l'application simultanée de ces méthodes, il résulte que le diagnostic de la coqueluche a pu être confirmé — pendant différentes périodes de la maladie — comme suit:

— par la méthode bactériologique chez 25% des enfants examinés;
— par la réaction d'agglutination chez 75% des enfants examinés;
— par la réaction cutanée chez 75% des enfants examinés;
— par l'indice opsono-cytophagique chez 87,5% des enfants examinés;
— par le leucogramme chez 87,5% des enfants examinés;
— par l'application simultanée des 5 méthodes chez 95% des enfants examinés.

Par rapport à la période de la maladie (Tableau II), nous constatons que les résultats des 5 méthodes coïncident pendant la *première semaine* dans 57,14% des cas (réactions parallèlement positives — 28,57%, réactions parallèlement négatives — 28,57%). Dans 14,2% des cas les tests bactériologique et IOC étaient positifs, par contre, les tests IDR, A et le leucogramme ont donné des résultats négatifs; dans un second lot (14,2%) on a eu les tests IOC et IDR positifs et les tests bactériologique, A et le leucogramme négatifs. Dans un dernier lot (14,2%) les tests IOC et A étaient positifs et les tests bactériologique, IDR et le leucogramme négatifs.

Parmi les enfants examinés pendant la *seconde semaine* 33,33% présentaient tous les 5 tests positifs, 33,33% ont eu le test bactériologique négatif et l'IDR, l'A, l'IOC et le leucogramme positifs; 16,66% ont présenté les tests A et IOC positifs associés aux tests bactériologique, IDR et du leucogramme, négatifs; 16,66% des enfants avaient l'IOC et le leucogramme positifs et le test bactériologique, A et IDR négatifs.

Chez les enfants hospitalisés la *troisième* et la *quatrième semaine* on a constaté une augmentation du nombre des malades avec un test bactériologique négatif associé aux tests A, IOC, IDR et du leucogramme positifs (70% et respectivement 53,8% des cas) (Tableau II).

*Tableau II*

**Diagnostic bactériologique séro-allergique complexe par rapport à la période de maladie (coqueluche)**

| RÉACTION | | | | | I-e sem. | | II-e sem. | | III-e sem. | | IV-e sem. | | Après 4 sem. | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Bact. | Agglut. | IOC | IDR. | Leuc. | Nombre enf. | % | Nombre enf. | % | Nombre enf. | % | Nombre enf. | % | Nombre enf. | % |
| + | + | + | + | + | 2/7 | 28,4 | 2/6 | 33,33 | 2/10 | 20 | 4/13 | 30,7 | | |
| + | + | + | − | + | | | | | | | | | 1/4 | 25,0 |
| + | − | + | − | − | 1/7 | 14,2 | | | | | | | | |
| − | + | + | + | + | | | 2/6 | 33,33 | 7/10 | 70 | 7/13 | 53,8 | 1/4 | 25,0 |
| − | − | + | − | + | 1/7 | 14,2 | 1/6 | 16,66 | 1/10 | 10 | 1/13 | 7,6 | | |
| − | − | − | + | + | | | | | | | | | 1/4 | 25,0 |
| − | + | + | − | − | | | 1/6 | 16,66 | | | | | | |
| − | − | − | + | + | | | | | | | 1/13 | 7,6 | | |
| − | − | + | + | − | 1/7 | 14,2 | | | | | | | | |
| − | | + | − | + | | | | | | | | | 1/4 | 25,0 |
| − | − | − | − | − | 2/7 | 28,4 | | | | | | | | |
| Nombre total enfants (40) | | | | | 7 | | 6 | | 10 | | 13 | | 4 | |

*Légende* — Examen bactériologique = Bact.
— Réaction d'agglutination = Agglut.
— Indice opsono-cytophagique = IOC
— Réaction intradermique = IDR.
— Leucogramme = Leuc.

*Après* 4 *semaines* aucun des enfants ne présentait plus les 5 tests positifs; n enfant (25,1%) a eu l'examen bactériologique négatif associé aux tests A, OC, IDR et le leucogramme positifs, le second enfant — les tests bactériologique, , IOC et le leucogramme positifs associés à l'IDR négative, le troisième enfant — es tests bactériologique, A et IOC négatifs avec l'IDR et le leucogramme positifs, nfin, le quatrième enfant a présenté l'IOC et le leucogramme positifs associés ux tests bactériologique, A et IDR négatifs (Tableau II).

Du tableau II ressort la corrélation entre les 5 méthodes dont les résultats arallèlement positifs atteignent un maximum pendant la troisième et la quarième semaine. Par conséquent, la réaction cutanée effectuée avec un allergène xtrait par voie chimique de la *B. pertussis*, en corroboration avec les autres néthodes, représente un apport important qui complète les données nécessaires u problème du diagnostic complexe bactériologique-sérologique-allergique de la oqueluche. La valeur du diagnostic complexe bactériologique-séro-allergique st confirmée par le grand nombre de résultats parallèlement positifs (95%) btenus chez les enfants malades avec symptômes cliniques typiques ou atypiques le coqueluche.

Vu les résultats obtenus par l'application du diagnostic complexe bactériogique-séro-allergique, les enfants ayant présenté les 5 analyses négatives (5%) 'ont pas été considérés comme malades de coqueluche. Les données obtenues rouvent que par cette méthode le diagnostic de coqueluche a été confirmé ans 95% des cas et infirmé dans 5%; par conséquent on peut affirmer que le iagnostic de cette maladie a été assuré dans 100% des cas (Tableau II).

## CONCLUSIONS

On a étudié la valeur du diagnostic complexe bactériologique-séro-allergique e la coqueluche en effectuant simultanément, dans l'intervalle de 24—48 heures, examen bactériologique, la réaction d'agglutination, l'indice opsono-cytophaique, la réaction cutanée avec un allergène extrait chimiquement de la *B. pertussis* t le leucogramme.

On a constaté une étroite corrélation entre ces méthodes de diagnostic, ui atteint son point culminant pendant la troisième et la quatrième semaine le maladie.

Le plus grand nombre de réactions discordantes est rencontré pendant a première semaine et à partir du 30-e jour. Les premiers jours, l'examen actériologique, l'indice opsono-cytophagique et souvent aussi la réaction d'agglutination sont positifs; les jours suivants le leucogramme et la réaction cutanée onnent un pourcentage élevé de réactions positives. Le diagnostic bactériolique devient négatif le premier (après 3 semaines). A partir de la quatrième emaine on observe de plus en plus rarement des réactions cutanées ositives.

En ce qui concerne la durée, les examens qui restent le plus longtemps ositifs sont l'indice opsono-cytophagique et l'agglutination.

Les données obtenues par les 5 méthodes se complètent et assurent le diagnosic de la coqueluche en proportion de 100%, prouvant la nécessité d'appliquer ans cette maladie le diagnostic complexe bactériologique-sérologique et llergique.

BIBLIOGRAPHIE

1. Arvidson Mp., Hedlung P. et Mossberg H. — Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1953, **5**, 44.
2. Barber C. et Soare I. — Arch. Roum. de Pathol. Exp. et de Microbiologie, 1958, **17**, 119.
3. Berzina I.A. — Koklius (Coqueluche) Moscou, Ed. Med. U.R.S.S., 1948.
4. Bonciu C., Soare I. Barber C. et Petrovici M. — Microbiol., Parazitol., Epidemiol. 1957, **2**, 161.
5. Eldering G. — Journ. Hyg. 1942, **36**, 294.
6. Flossdorf E.W. et Kiwball A.C. — Journal Immunol., 1940, **39**, 287.
7. Gordienko E.K. — Travaux de l'Institut Ucrainien, 19 (trad.) 1954, Dossier 3451, 55—61,
8. Kuznetsova L.S. — J. Mikrobiol., Epidemiol., Immunobiol., 1959, no. 7, 85.
9. Smolens J. Mudd. — J. Immunol., 1943, **47**, 155.
10. Soare I. et Barber C. — Microbiol., Parazitol., Epidemiol., 1957, **2**, 161.
11. Soare I., Simu C. et Marx A. — Arch. Roum. de Pathol. Exp. et de Microbiologie, 1957, **16**, 125.
12. Soare I., Simu C., Golaesco M., Spiner F., Marcovici M. et Crăcea E. — Arch. Roum. de Pathol. Exp. et de Microbiologie, 1958, **17**, 523.
13. Soare I., Golaesco M. et Teodoresco A. — Microbiol., Parazitol., Epidemiol. 1959, **1**, 87.
14. Soare I., Golaesco M. et Teodoresco A. — Arch. Roum. de Pathol. Exp. et de Microbiologie, 1959, **18**, 261.
15. Skliarova N.N. et Sofronov B. — N. J. Med. Exper. Immunol., 1956, No. 4, 25.
16. Soare I., Barber C., Golăesco M., Zaharia V., Natansohn R. et Vulcan V. — (Sous presse).

## КОМПЛЕКСНАЯ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКАЯ СЕРО-АЛЛЕРГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА КОКЛЮША

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Изучали ценность комплексной бактериологической-серо-аллергической диагностики при коклюше, осуществляемой путём одновременного проведения бактериологического исследования, реакции агглютинации, опсоно-фагоцитарного индекса, кожной реакции при помощи аллергена, и лейкограммы; причём материал для этих исследований брали в тот-же день или на расстоянии 1—2 дней.

Установлено, что между изучаемыми способами диагноза существует тесная взаимосвязь, наиболее выраженная в III-ей и IV-ой неделе.

В течение первых 5—6 дней и после 30 дней встречается наибольшее количество несоответствующих реакций. Так, в течении первых дней бывают положительными: бактериологическое исследование, опсоно-фагоцитарный индекс и нередко реакция агглютинации; после первых дней лейкограмма и кожная реакция становятся положительными в высоком проценте. Бактериологическое исследование становится отрицательным скорее всех (после 3—4 недель) а кожная реакция редко обнаруживается положительной после 4-х недель.

Опсоно-фагоцитарный показатель и агглютинация остаются положительными в течении более долгого срока.

Полученные данные комплексируются между собой, обеспечивая диагностику коклюша в 95—100% случаев.

Все это доказывает необходимость проведения при коклюше комплексной бактериологической-серо-аллергической диагностики.

## DIE KOMPLEXE BAKTERIOLOGISCHE, SEROLOGISCHE UND ALLERGISCHE DIAGNOSE BEI KEUCHHUSTEN

ZUSAMMENFASSUNG

Der Wert der komplexen bakteriologischen, serologischen und allergischen Diagnose bei Keuchhusten wurde durch die gleichzeitige Ausführung der bakteriologischen Untersuchung, der Agglutinationsreaktion, der phagozytischen Zahl, des allergischen Hauttests und

des Leukogramms untersucht. Das Untersuchungsmaterial wurde am gleichen Tag oder im Verlauf von 1—2 Tagen entnommen.

Es wurde festgestellt, dass zwischen den geprüften Untersuchungsmethoden eine weitgehende Übereinstimmung besteht, die in der 3. und 4. Woche am ausgeprägtesten ist.

Während der ersten 5—6 Tage und nach dem 30. Tag kommen die meisten nichtübereinstimmenden Reaktionen vor. So sind während der ersten Tage die bakteriologische Untersuchung, die phagozytische Zahl und oft auch die Agglutinationsreaktion positiv. Nach Ablauf der ersten Tage werden das Leukogramm und die Hautreaktion in hohen Prozentsätzen positiv. Die bakteriologische Untersuchung wird am schnellsten negativ (nach 3 bis 4 Wochen) und nach 4 Wochen ist die Hautreaktion seltener positiv.

Was die Beständigkeit anbetrifft, sind die Bestimmung der phagozytischen Zahl und die Agglutination diagnostische Verfahren, die längere Zeit positive Ergebnisse liefern.

Die erhaltenen Ergebnisse vervollständigen einander, so dass die Keuchhustendiagnose in 95—100% der Fälle gestellt werden kann.

Dies weist auf die Notwendigkeit der komplexen bakteriologisch-serologisch-allergischen Diagnose bei Keuchhusten hin.

## THE COMPLEX BACTERIOLOGICAL, SEROLOGICAL AND ALLERGIC DIAGNOSIS IN HOOPING-COUGH

SUMMARY

The value of complex bacteriological-serological-allergic diagnosis in hooping-cough was investigated by the simultaneous performance of the bacteriological examination, the agglutination reaction, the opsonocytophagic index, the cutaneous allergy test, and the leucocyte count. The material to be tested was collected on the same day or at 1—2 days' interval.

A close correlation was found to exist between the diagnostic methods investigated, maximum concordance being attained in the 3rd and 4th weeks of the disease.

During the first 5—6 days and after the 30th day the highest incidence rate of discordant reactions is recorded. Thus, bacteriological tests, the opsonocytophagic index and often the agglutination reaction are positive in the first few days. Subsequently, the leucocyte count and the skin test become positive in high percentage rates. Bacteriological tests are the first to become negative (after 3—4 weeks), and after the 4th week skin tests are seldomer positive.

As regards persistence, the opsonocytophagic index and the agglutination reaction are diagnostic tests which remain positive for a longer period.

The finding made complete each other to yield a diagnosis of hooping-cough in 95—100 per cent of the cases.

This proves the necessity to apply the complex method of bacteriological-serological-allergic diagnosis in hooping-cough.

# ÜBER DIE LYSOGENIE UND LYSOSENSIBILITÄT BEI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*. LYSOTYPIEVERSUCHE

von

T. Meitert und Eugenia Meitert

*Arbeit aus dem Institut « Dr. I. Cantacuzino »*

— Eingegangen am 20. Iuli 1960 —

Über das Vorkommen eines lytischen, übertragbaren anti-Pyozyaneus Prinzips haben verschiedene Forscher schon seit 1923 berichtet. (1—12). Gleichzeitig konnte man durch die Erforschung der endogenen Phagen bei Pseudomonas aeruginosa einen hohen Prozentsatz von lysogenen Stämmen, der unter Umständen manchmal sogar 100% erreichte (Conge, 13), feststellen.

Im Laufe dieser Beobachtungen konnte unwiederlegbar festgestellt werden, dass man als regelrechte Phagenlöcher nur diejenigen ansehen darf, welche die Übertragbarkeitseigenschaft des lytischen Prinzips besitzen, während die sogenannten „metallischen Flecken" („taches métalliques"), welche eine teilweise Lysis mit metallischem Glanz, besonders unter Schrägbeleuchtung aufweisen, nicht in Zusammenhang mit der Anwesenheit der spezifischen Phagen stehen (Pseudo- Phagenlöcher oder Pseudolysis). (3,6—8, 13, 14).

In den letzten Jahren wurden die lysogenen *Pseudomonas aeruginosa* Stämme benützt um die Einwirkung von verschiedenen Stoffen oder Nährbodenfaktoren sowie auch den Einfluss einiger physikalischen Agentien (U.V.-, X- und Gammastrahlen) gegenüber Phagen-Bakterien-Systemen zu untersuchen. (15 — 23)

In einer vorangehenden Arbeit haben wir über unsere Ergebnisse bei der Herstellung von aktiven Pyozyaneus-Phagen aus verschiedenen pathologischen Produkten, sowie auch aus Abwasser oder lysogenen Stämmen berichtet und bei dieser Gelegenheit einen Prozentsatz von 58,3% lysogenen Stämmen beobachtet.

In der vorliegenden Arbeit wurden bei 109 Pyozyaneus-Stämmen die Lysogenie und die Lysosensibilität gleichzeitig und vergleichend untersucht. Danach wurden bestimmte endogene Phagen mit verschiedenem Wirkungsspektrum für ein vorläufiges Lysotypie-Schema benützt, da es in dieser Hinsicht, unserer Kenntnis nach, nur wenige Veröffentlichungen gibt. (25 — 26)

## MATERIAL UND METHODIK

Es wurden 109 Pyozyaneus-Stämme *(Pseudomonas aeruginosa)* aus verschiedenen pathologischen Produkten (Harn, Faeces, Blut, Pleuraexsudat, Augensekretion, Eiter verschiedener Herkunft u.s.w.) untersucht.

Die Lysogenie dieser Stämme wurde mit Hilfe von 24 stundenalten, 60 Minuten-lang inaktivierten Kulturen in Peptonwasser geprüft.

Die Lysosensibilität gegenüber den inaktivierten Kulturen wurde auf mit 1—2 stundenalter Kultur in Peptonwasser beimpftem 2%-igem Nähr-Agar in Petri-Schalen untersucht. Die Testkultur wurde durch Überimpfen einer 24 Stunden bebrüteten Kultur in Peptonwasser hergestellt. Ablesung nach 24-stündiger Bebrütung bei 37°C.

Gleichzeitig wurde auch die Empfindlichkeit gegenüber einem polyvalenten Pyozyaneus-Phagen untersucht.

## ERGEBNISSE

Von 109 untersuchten Stämmen waren 97 (89%) lysogen und 76 Stämme (69,7%) gegenüber verschiedenen endogenen Phagen oder gegenüber einem

*Tabelle 1*

**Zahlenmässige Verteilung der Pseudomonas aeruginosa-Stämme auf Grund des „Lysogenie-Grads" (LgG) und des „Lysosensibilitäts-Grads" (LsG)**

| LgG \ LsG | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 38 | 41 | insgesamt |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 4 | | | 1 | | 1 | 1 | 2 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | | 1 | | 12 |
| 1 | 5 | 8 | | 1 | | 2 | | 2 | | | 1 | | | | | 1 | | | | | | | | | 1 | | | | 21 |
| 2 | 6 | 1 | 1 | 2 | | | 2 | 1 | 2 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | 17 |
| 3 | 5 | 2 | | | | | | 1 | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | 9 |
| 4 | 1 | 4 | 2 | 1 | | | | | 2 | | | | 1 | | | | 1 | | | | | 1 | | | | | | | 13 |
| 5 | 3 | 2 | | | | | 1 | | 1 | | 1 | | | | | | 1 | | 1 | | | | | | | | | | 10 |
| 6 | 2 | 2 | 3 | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 8 |
| 7 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 2 |
| 8 | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 9 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0 |
| 10 | 1 | | | | | 1 | | | | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | 3 |
| 11 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | | | | | | | 2 |
| 12 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 2 |
| 13 | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 14 | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 15 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0 |
| 16 | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | | | 2 |
| 17 | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 18 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0 |
| 19 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0 |
| 20 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0 |
| 21 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0 |
| 22 | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 23 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0 |
| 24 | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 25 | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 46 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| insgesamt | 33 | 24 | 7 | 6 | 2 | 4 | 4 | 6 | 6 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 2 | 1 | 1 | 1 | 109 |

polyvalenten Pyozyaneus-Phagen lysosensibel. 68 Stämme (62,3%) waren gleichzeitig lysogen und lysosensibel (gegenüber den isolierten endogenen Phagen), 29 Stämme (26,6%) gleichzeitig lysogen und lysoresistent, 8 Stämme (7,3%) gleichzeitig nichtlysogen und lysosensibel und 4 Stämme (3,6%) gleichzeitig nichtlysogen und lysoresistent.

Die lysogenen Stämme waren nie gegenüber der eigenen inaktivierten Bakterienaufschwemmung sensibel. Dagegen konnte jedoch beobachtet werden, dass Stämme deren inaktivierte Bakterienaufschwemmungen mehrere Stämme lysierten, ihrerseits von mehreren verschiedenen inaktivierten Bakterienaufschwemmungen lysiert wurden.

In Tabelle No. 1 sind die Zahlen angegeben, welche bei den 109 untersuchten *Pseudomonas aeruginosa*-Stämmen den von uns so genannten „Lysogenie-Grad" (LgG) und den „Lysosensibilitäts-Grad" (LsG) ausdrücken. Der LgG zeigt die Anzahl der Stämme, welche von einer inaktivierten Bakterienaufschwemmung lysiert werden und der LsG die Anzahl der inaktivierten Bakterienaufschwemmungen, welche ein und denselben Stamm zu lysieren vermögen.

Aus der Tabelle No. 1 geht hervor, dass der LgG für die meisten Stämme zwischen 1 und 12 lag, während nur bei wenigen Stämmen höhere Zahlen (bis 46) zu vermerken sind.

Ähnlicherweise kann man beobachten, dass die meisten Stämme einen kleinen LsG aufwiesen (von 1 bis 14) und nur wenige einen höheren LsG (bis 41) besassen.

Gleichzeitig konnte man feststellen, dass von den 109 untersuchten Stämmen nur 37 (34%) von einem polyvalenten Pyozyaneus-Phagen lysiert wurden. Aus Tabelle Nr. 1 ist noch zu entnehmen, dass die meisten Stämme mit hohem LgG weniger sensibel, während die Stämme mit hohem LsG geringer lysogen sind.

Trotzdem aber gibt es auch gut lysosensible Stämme, die gleichzeitig ausgesprochen lysogen sind (z.B: ein Stamm mit LsG = 25 und LgG = 16 oder ein anderer Stamm mit LsG = 22 und LgG = 11 u.s.w.).

Ebenfalls ist ersichtlich, dass der Stamm mit dem grössten LgG (= 46) lysoresistent, während der Stamm mit dem grössten LsG (= 41) lysogen ist (LgG = 2).

Im zweiten Teil der Untersuchungen wurde mit Hilfe von 13 der hergestellten endogenen Phagen ein vorläufiges Lysotypie-Schema aufgestellt (Tabelle No. 2)

Der Tabelle No. 2 ist zu entnehmen, dass es mit Hilfe von 13 endogenen Bakteriophagen (A bis M) möglich war, 73 Stämme (67%) in 13 verschiedene Gruppen (ebenfalls mit den Buchstaben A bis M gekennzeichnet) aufzuteilen.

Die Stämme der Gruppe A werden daran erkannt, dass sie von dem Phagen A lysiert werden; die Stämme der Gruppe B werden vom Phagen B lysiert aber nicht auch vom Phagen A; die Stämme der Gruppe C werden vom Phagen C aber nicht auch von den Phagen A und B lysiert u.s.w.

Durch die Anwendung der 13 Phagen ist es möglich im Rahmen der Gruppen A, B, C, D, E, F und G eine Reihe von Lysotypen aufzustellen ($A_1$, $A_2$, $A_3$, ..., $B_1$, $B_2$, $B_3$ ... u.s.w.), während bei den anderen Gruppen (H, I, J, K, L

*Tabelle 2*

**Vorläufiges Lysotypie-Schema für Pseudomonas aeruginosa**

| Gruppe | Lysotyp | Bakteriophagen A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | Zahl der Stämme abs. | % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A 10 Stämme = 9,1% | $A_1$ | OL | | | | | 3+n | 3+n | | | | | | | 2 | 1,8 |
| | $A_2$ | CL | | | | | | | | | | | | | 1 | 0,91 |
| | $A_3$ | OL | | OL | | | | | OL | | | | | | 1 | 0,91 |
| | $A_4$ | $CL^{+}_{cr}$ | | | | | | | $CL^{+}_{cr}$ | | | | | | 1 | 0,91 |
| | $A_5$ | OL | | OL | OL | | | OL | | | | | | | 1 | 0,91 |
| | $A_6$ | OL | OL | OL | OL | OL | CL | $CL^{+}_{cr}$ | | | | | | | 1 | 0,91 |
| | $A_7$ | CL | | OL | OL | | | | | OL | | | | | 1 | 0,91 |
| | $A_8$ | $CL^{+}_{cr}$ | | | | | OL | | $CL^{+}_{cr}$ | OL | | | | | 1 | 0,91 |
| | $A_9$ | $CL^{+}_{cr}$ | | OL | OL | OL | | | 2+n | | | 1+n | | | 1 | 0,91 |
| B 10 Stämme = 9,1% | $B_1$ | | OL | | | | | | | | | | | | 2 | 1,8 |
| | $B_2$ | | $CL^{+}_{cr}$ | | | | | OL | | | | | | | 1 | 0,91 |
| | $B_3$ | | $CL^{+}_{cr}$ | | | | | OL | $CL^{+}_{cr}$ | | | | | | 1 | 0,91 |
| | $B_4$ | | 1+n | $CL^{+}_{cr}$ | | $CL^{+}_{cr}$ | $CL^{+}_{cr}$ | $CL^{+}_{cr}$ | $CL^{+}_{cr}$ | | | | | | 1 | 0,91 |
| | $B_5$ | | $CL^{+}_{cr}$ | | | | | | $CL^{+}_{cr}$ | | | | | | 3 | 2,7 |
| | $B_6$ | | OL | | | | | | OL | OL | | | | | 1 | 0,91 |
| | $B_7$ | | OL | OL | OL | $CL^{+}_{cr}$ | $CL^{+}_{cr}$ | $CL^{+}_{cr}$ | OL | | CL | | | | 1 | 0,91 |
| C 3 Stämme = 2,7% | $C_1$ | | | OL | | $CL^{+}_{cr}$ | $CL^{+}_{cr}$ | $CL^{+}_{cr}$ | | | | | | | 1 | 0,91 |
| | $C_2$ | | | OL | OL | | CL | CL | | | | | | | 1 | 0,91 |
| | $C_3$ | | | OL | OL | $CL^{+}_{cr}$ | CL | OL | | OL | | | | | 1 | 0,91 |
| D 5 Stämme = 4,6% | $D_1$ | | | | $CL^{+}_{cr}$ | $CL^{+}_{cr}$ | | | | | | | | | 1 | 0,91 |
| | $D_2$ | | | | $CL^{+}_{cr}$ | OL | CL | $CL^{+}_{cr}$ | $CL^{+}_{cr}$ | | | | | | 2 | 1,8 |
| | $D_3$ | | | | $CL^{+}_{cr}$ | | OL | OL | $CL^{+}_{cr}$ | | | | | | 1 | 0,91 |
| | $D_4$ | | | | $CL^{+}_{cr}$ | | OL | OL | | | | OL | | | 1 | 0,91 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| E<br>6 Stämme<br>= 5,5% | $E_1$<br>$E_2$<br>$E_3$<br>$E_4$ | | | | | OL<br>OL<br>$CL^+_{cr}$<br>$CL^+_{cr}$ | OL<br>$CL^+_{cr}$<br>OL | $CL^+_{cr}$<br>$CL^+_{cr}$ | | OL | | OL | $CL^+_{cr}$ | | 1<br>3<br>1<br>1 | 0,91<br>2,7<br>0,91<br>0,91 |
| F<br>7 Stämme<br>= 6,4% | $F_1$<br>$F_2$<br>$F_3$<br>$F_4$ | | | | | | OL<br>OL<br>OL<br>CL | OL<br>OL<br>OL | | OL | | | $CL^+_{cr}$ | | 2<br>2<br>2<br>1 | 1,8<br>1,8<br>1,8<br>0,91 |
| G<br>23 Stämme<br>= 21,1% | $G_1$<br>$G_2$ | | | | | | | $CL^+_{cr}$<br>$CL^+_{cr}$ | $CL^+_{cr}$ | | | | | | 22<br>1 | 20,2<br>0,91 |
| H<br>1 Stamm<br>= 0,91% | $H_1$ | | | | | | | | OL | | | | | | 1 | 0,91 |
| I<br>2 Stämme<br>= 1,8% | $I_1$ | | | | | | | | | OL | | | | | 2 | 1,8 |
| J<br>1 Stamm<br>= 0,91% | $J_1$ | | | | | | | | | | OL | | | | 1 | 0,91 |
| K<br>1 Stamm<br>= 0,91% | $K_1$ | | | | | | | | | | | $CL^+_{cr}$ | | | 1 | 0,91 |
| L<br>3 Stämme<br>= 2,7% | $L_1$ | | | | | | | | | | | | OL | | 3 | 2,7 |
| M<br>1 Stamm<br>= 0,91% | $M_1$ | | | | | | | | | | | | | SCL | 1 | 0,91 |

*Zeichenerklärung:*

CL = confluent lysis (völlig gelöst)
OL = opake Lysis
SCL = semiconfluent lysis (halbgelöst)
$CL^+_{cr}$ = confluent lysis mit resist. Kolonien

1+n = 5—10 Phagenlöcher
2+n = 10—50 Phagenlöcher
3+n = über 50 Phagenlöcher

und M, deren eine kleinere Anzahl von Stämmen angehören) eine Unterteilung nicht möglich war.

In Tabelle No. 2 werden die Anzahl und der Prozentsatz der Stämme angegeben, welche den verschiedenen Gruppen und Lysotypen angehören.

## DISKUSSION UND SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die Ermittlung eines hohen Prozentsatzes (89%) von lysogenen Stämmen dürfte unserer Meinung nach im Zusammenhang mit der grossen Anzahl der benützten Teststämme (109) und andererseits mit den partikulären Lysosensibilitätseigenschaften derselben stehen.

Es kommt deutlich zum Ausdruck, dass durch die Benützung von wenigeren Teststämmen der Prozentsatz der Lysogenie viel geringer gewesen wäre. Wenn wir zum Beispiel als Teststämme zufälligerweise nur die 33 lysoresistenten Stämme benützt hätten — was doch eine ziemlich grosse Anzahl von Teststämmen darstellt — wäre trotzdem der Prozentsatz der Lysogenie 0% gewesen. Ebenfalls ist hervorzuheben, dass durch die Anwendung eines einzigen Teststammes — selbst falls es sich um den Stamm mit dem grössten LSG (= 41) gehandelt hätte — der Prozentsatz der Lysogenie doch nicht höher als 41% gewesen wäre.

Die Auswahl der sehr lysosensiblen Stämme ermöglicht die Anwendung einer kleinen Anzahl von Teststämmen mit Hilfe derer ein höchstmöglicher Prozentsatz der Lysogenie erfasst werden kann. In unserem Fall wären mindestens 13 ausgewählte Teststämme dafür notwendig gewesen.

Was die lysosensiblen Stämme anbelangt ist zu beobachten, dass der LSG von der Anzahl der geprüften inaktivierten Bakterienaufschwemmungen und deren LGG abhängig ist. Mit anderen Worten, Stämme welche lysoresistent sind wenn man sie nur gegenüber einer kleinen Anzahl von inaktivierten Bakterienaufschwemmungen prüft, erweisen sich eigentlich als lysosensibel wenn noch weitere inaktivierte Bakterienaufschwemmungen hinzugefügt werden und insbesondere wenn diese letzten zugleich auch einen hohen LGG aufweisen.

Angesichts dieser Gründe ist es demnach nicht angebracht von lysosensiblen und lysogenen „Standard"-Stämmen zu sprechen, da es gut lysosensible Stämme gibt die zugleich auch lysogen sind und Stämme mit hohem LGG die gleichzeitig gegenüber vielen inaktivierten Bakterienaufschwemmungen sensibel sind.

Es bleibt die Frage offen, ob der verschiedengrosse LGG bei den untersuchten Stämmen in Beziehung zu einer wahren „Polylysogenie" steht, oder ob es sich um das Vorhandensein endogener Phagen mit polyvalentem Spektrum handelt.

Das vorgeschlagene Lysotypie-Schema, welches mit Hilfe von 13 endogenen Phagen ungefähr 67% der Stämme in 13 Gruppen einteilt, stellt 39 Lysotypen auf. Von diesen ist der Lysotyp $G_1$ hervorzuheben da er eine grössere Anzahl der untersuchten Stämme umfasst. (20,2%).

Die vorliegenden Lysotypieversuche stellen nur den Anfang noch im Gange befindlicher Untersuchungen dar, im Laufe derer für die jeweiligen Lysisspektren die wirksamsten Phagen ausgewählt wurden. Es ist notwendig, dass weiterhin die Stabilität der verschiedenen Lysotypen, besonders für epidemiologische Zwecke im Rahmen der Krankenhausinfektionen untersucht wird.

SCHRIFTTUM

1. Combiescu D. und Magheru A. — C.R. Soc. Biol., 1923, **88**, 1912.
2. Cancik J. — Cas. ces. lek., 1923, H. 2.
3. Okuda S. — Wien. klin. Wschr., 1923. **36**, 125.
4. Hauduroy P. et Peyre E. — C.R. Soc. Biol., 1923, **88**, 688.
5. Pons R. — C.R. Soc. Biol., 1923, **89**, 77.
6. Lode A. — Arch. Hyg., 1923, **93**, 267.
8. Sonnenschein. — Zblt. Bakt., I. Orig., 1927, **104**, 365.
9. Hadley P. — J. inf. Dis., 1924, **34**, 260.
9. Gate J. und Gardere H. — C.R. Soc. Biol., 1927, **96**, 545.
10. Proca G. — C.R. Soc. Biol., 1938, **129**, 331.
11. Fastier B. — J. Bact., 1945, **50**, 301.
12. Alföldi L. — Acta Microbiol. sci. Hung., 1957, **4**, 119.
13. gonge G. — Ann. Institut Pasteur, 1948, **75**, 368.
14. Asheshova I. — C.R. Soc. Biol., 1926, **95**, 1029.
15. Dickinson L. — J. gen. Microbiol., 1948, **2**, 154.
16. Dickinson L. und Codd. — J. gen. Microbiol., 1952, **6**, 1.
17. Jacob F. — C.R. Acad. Sci., 1950, **231**, 1585.
18. Jacob F. — Ann. Inst. Pasteur, 1952, **82**, 433 und 578.
19. Jacob F. — Ann. Inst. Pasteur, 1952, **83**, 671.
20. Jacob F. — Les bactéries lysogènes et la notion de provirus, Paris, Masson, 1954.
21. Tobin J.O.H. — Brit., J. exp. Path., 1953. **34**, 635.
22. Ciuca M., Meitert T., Meitert E. und Meitert St. — IV. Tagung der Med. Fakult., Bukarest, 1958, S. 47; Arch. Roum. Path. exp. 1960 (im Druck).
23. Meitert E. und Meitert T. — Microbiol., Parazitol., Epidemiol., 1958, H. 6, 535.
24. Warner. — Brit. J. exp. Path., 1950. **31**, 112.
25. Potel J. — Naturwissenschaften, 1957, 44, 332.
26. Pavlatou M. und Hassikou E. — Acta Microbiol. Hellenica, 1959, **4**, 57.

## ИЗУЧЕНИЕ ОТНОШЕНИЙ МЕЖДУ ЛИЗОГЕНИЕЙ И ЛИЗОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ У *Pseudomonas aeruginosa*. ПОПЫТКИ ЛИЗОТИПИИ.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Изучали одновременно лизогенность и лизочувствительность 109 штаммов *Pseudomonas aeruginosa;* обнаружено 89% лизогенных штаммов и 70% лизочувствительных штаммов.

Оказались:

— лизогенными и в то же время лизочувствительными к выделенным эндогенным фагам ..... 68 (62,3%) штаммов
— лизогенными и в то же время лизоустойчивыми к выделенным эндогенным фагам ..... 29 (26,6%) штаммов
— нелизогенными и лизочувствительными к выделенным эндогенным фагам ..... 8 (7,3%) штаммов
— нелизогенными и лизоустойчивыми к выделенным эндогенным фагам ..... 4 (3,6%) штаммов

Оценивая условно «степень лизогенности» по количеству разных индикаторных штаммов, лизируемых тем же препаратом и «степень лизочувствительности» по восприимчивости к большему или меньшему количеству эндогенных фагов, установлено, что у штаммов, обладающих большой степенью лизогенности, есть тенденция к меньшей лизочувствительности, в то время как сильно лизочувствительные штаммы проявляют в общем меньшую степень лизогении. Однако нередко встречаются штаммы, обладающие одновременно большой степенью лизогенности и лизочувствительности.

Обнаружена также зависимость между процентом лизогении (или лизочувствительности) и количеством применяемых индикаторных штаммов (или инактивированных препаратов).

Применяя 13 эндогенных фагов, удалось группировать 73 штамма (67%) в 13 разных фаговых групп (обозначенные от A до M), часть которых могут быть подразделены в лизотипы ($A_1$, $A_2$, $A_3$ и т.д. $B_1$, $B_2$, $B_3$ и т.д.), составляя 39 фаговых типов.

Эта временная схема лизотипии подлежит пополнению, причем необходимо исследовать стойкость полученных лизотипов, также как и эпидемиологическую ценность предлагаемого метода, особенно при внутрибольничных инфекциях.

## OBSERVATIONS SUR LES RAPPORTS ENTRE LA LYSOGÉNIE ET LA LYSOSENSIBILITÉ CHEZ LA *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*. ESSAIS DE LYSOTYPIE

RÉSUMÉ

1. L'étude concomitante de la lysogénéité et la lysosensibilité de 109 souches de *Pseudomonas aeruginosa* a eu comme résultat 89% souches lysogènes et 70% souches lysosensibles envers les phages endogènes isolés, comme suit:

— lysogènes et en même temps lysosensibles . . . . . .68 (62,3%) souches;
— lysogènes et en même temps lysorésistantes . . . . . .29 (26,6%) souches;
— non-lysogènes et en même temps lysosensibles . . . . 8 (7,3%) souches;
— non-lysogènes et en même temps lysorésistantes . . . . 4 (3,6%) souches.

Le *degré de lysogénéité*, apprécié arbitrairement par le nombre des différentes souches indicatrices lysées par les mêmes préparations inactivées et le *degré de lysosensibilité* par la susceptibilité de lyse vis-à-vis d'un nombre plus ou moins grand de phages endogènes ont montré une tendance des souches à un degré élevé de lysogénéité à être moins lysosensibles, tandis que les souches très lysosensibles sont en général celles qui présentent un degré plus réduit de lysogénie. Cependant, on rencontre fréquemment des souches qui présentent en même temps des degrés élevés de lysogénéité et de lysosensibilité.

On montre également la dépendance qui existe entre le pourcentage de la lysogénie (respectivement de la lysosensibilité) et le nombre des souches indicatrices (respectivement des inactivés) employées.

Utilisant 13 phages endogènes, on a réussi à grouper 73 souches (67%) en 13 groupes phagiques différents (notés de A à M) dont une partie se sous-divise en lysotypes ($A_1$, $A_2$, $A_3$, etc., $B_1$, $B_2$, $B_3$, etc.) totalisant 39 types phagiques.

Ce schéma de lysotypie provisoire doit être complété, par des recherches simultanées sur la stabilité des lysotypes obtenus, ainsi que sur la valeur épidémiologique de la méthode, notament dans le cadre des infections intra-hospitalières.

## OBSERVATIONS CONCERNING THE RELATIONSHIP BETWEEN LYSOGENICITY AND LYSOSENSITIVITY IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*. ATTEMPTS AT LYSOTYPING

SUMMARY

Lysogenicity and lysosensitivity were concomitantly investigated in 109 strains of *Pseudomonas aeruginosa* : 89 per cent of the strains were found to be lysogenic, and 70 per cent to be lysosensitive to the endogenic phages isolated, as follows:

— lysogenic and at the same time lysosensitive . . . . . .68 strains (62,3%)
— lysogenic and at the same time lysoresistant . . . . . .29 strains (26,6%)
— non-lysogenic and at the same time lysosensitive . . . . 8 strains ( 7,3%)
— non-lysogenic and at the same time lysoresistant . . . . 4 strains ( 3,6%)

If the *degree of lysogenicity* is arbitrarily estimated according to the number of various indicator strains which are lysed by the same inactivated preparations, and the *degree of lysosensitivity* according to the susceptibility to a smaller or larger number of endogenic phages, the

strains displaying a high degree of lysogenicity are found to display a tendency to be less lysosensitive, while the strains which are very lysosensitive are, as a rule, those which display a lower degree of lysogenicity. However, strains which display a high degree of lysogenicity as well as of lysosensitivity are not frequently met with.

The percentage rates of lysogenicity (or of lysosensitivity) are shown to be related to the number of indicator strains (or of inactivated preparations) used.

By using 13 endogenic phages, 73 strains (67 per cent) could be divided into 13 different phage groups (listed from A to M) some of which may be further divided into lysotypes ($A_1$, $A_2$, $A_3$, etc., $B_1$, $B_2$, $B_3$ etc.) attaining a total number of 39 phage types.

This provisional pattern of lysotyping should be developped by investigations of the stability of the lysotypes obtained as well as of the epidemiological value of the method, in particular as applied to intra-hospital infections.

# RECHERCHES SUR LE MÉCANISME DE SYNTHÈSE DE LA PRODIGIOSINE PAR LE *SERRATIA MARCESCENS*

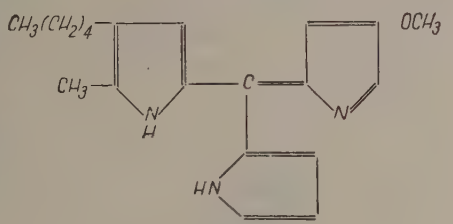
par

D. Stavri et A. Marx

*(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service de Physiologie Microbienne)*

— Manuscrit reçu le 29 septembre 1960 —

Le pigment élaboré par le *Serratia marcescens (Chromobacterium prodigiosus)* a constitué le sujet de nombreuses recherches; cependant, on n'est pas encore arrivé à déterminer son rôle biologique. L'hypothèse émise par certains auteurs que les pigments bactériens ne seraient que de simples déchets, ne présentant aucune signification du point de vue biologique, est inacceptable, car, dans ce cas il est plus que probable qu'au cours des générations cette capacité pigmentogène « inutile » se serait perdue (Mesrobeanu et Paunesco, 1960).




Prodigiosine

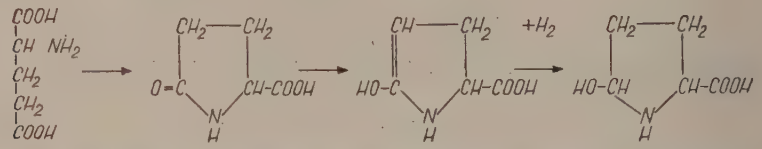
Le pigment élaboré par le *Serratia marcescens* isolé et identifié par Wrede et Hettche (1930) comme étant un tripyrryleméthane, le seul tripyrryleméthane existant dans la nature selon Hubbard et Rimington (1950) a pu être séparé en 4 fractions diversement colorées (Weiss 1949, Green, Rappaport et Williams 1956) associées à certaines particules de la membrane citoplasmatique (Purkaysha et Williams, 1960).

Tenant compte de la ressemblance structurale entre le tripyrryleméthane et la fraction porphyrinique de l'hémoglobine, Hubbard et Rimington (1950) en partant des travaux de Shemin et Rittenberg (1945) ont étudié à l'aide des isotopes marqués le rôle joué par le glycocolle dans la synthèse de la prodigiosine. Ces auteurs ont établi que du glycocolle utilisé par le *Serratia marcescens* dans son développement, sur un milieu contenant cet acide aminé marqué comme seule source d'azote, une proportion de 74% est utilisée pour la synthèse de la prodigiosine.

Dans le présent travail nous nous sommes proposé d'étudier si pour la production de la prodigiosine le *Serratia marcescens* n'emploie que le glycocolle, ou bien s'il a recours aussi à d'autres amino-acides qui, théoriquement, pourraient former un cycle pyrrolique.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

On a testé la capacité de plusieurs souches de *S. marcescens* de synthétiser le tripyrryleméthane (la prodigiosine) à partir de l'acide glutamique, utilisé comme unique source d'azote, vu que l'acide glutamique peut être facilement transformé en un noyau pyrrolique par chauffage en solution aqueuse, selon le schéma (2) établi par ABDERHALDEN et SCHWAB (1926).



Acide glutamique — Acide pyrrolidon carbonique — Acide α- oxypyrroline α'-carbonique — Acide α- oxypyrrolidine α'-carbonique

Afin de mettre en évidence l'effet de l'acide glutamique sur la pigmentogénèse du *Serratia marcescens* on a appliqué une méthode fondée sur la diffusion en agar. A la suite de recherches préliminaires, nous avons réalisé un milieu de culture synthétique permettant le développement des souches de *Serratia marcescens*, mais qui ne permet pas en même temps la production du pigment, ayant la composition suivante:

*Milieu de culture A*

| | | |
|---|---|---|
| $MgSO_4$ | 0,2 | g. |
| $KH_2PO_4$ | 2,0 | g. |
| Glycérine | 5 | ml. |
| Gélose | 20 | g. |
| Eau distillée | 1000 | ml |

pH = 7,2 — 7,4 avec NaOH 20%

Dans nos expériences nous avons également employé une variante de ce milieu de culture — le milieu B — dans lequel la glycérine a été remplacée par 4 g de glucose.

Les recherches ont été effectuées avec 4 souches de *Serratia marcescens* provenant de la collection de l'Institut „Dr. I. Cantacuzino", en employant la technique suivante:

Les deux milieux ont été fondus et répartis en boîtes Pétri. Après solidification, on a ensemencé la souche à étudier (culture de 24 heures sur gélose nutritive simple), montant sur chaque boîte un certain nombre de cylindres en verre, pareils aux cylindres employés pour la détermination de la sensibilité

aux antibiotiques par la méthode des cylindres. On introduit dans les cylindres par 3 gouttes de différentes dilutions d'acide glutamique en tampon phosphate pH = 7,0.

Les boîtes ensemencées ont été incubées pendant 24 heures à 37°C et maintenues ensuite pendant 24—48 heures à la température du laboratoire (21—22°C).

L'acide glutamique, par sa diffusion autour du cylindre, a permis la formation du pigment sur une zone circulaire, tandis que la souche développée sur le reste de la boîte a donné des colonies non-pigmentées. Les résultats sont consignés dans le tableau I.

*Tableau I*

**Elaboration de pigment par le *Serratia marcescens* sur les milieux synthétiques A et B, en présence d'acide glutamique et tampon phosphate—pH 7,0 (incubation 24 heures à 37°C et 48 heures à 21°C).**

| Souche | 1 | | 2 | | $LM_1$ | | $LM_2$ | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Milieu de culture | A | B | A | B | A | B | A | B |
| Acide glutamique | | | | | | | | |
| 0,031 % | 0 | 0 | 0 | 0 | + | 0 | + | 0 |
| 0,062 % | 0 | 0 | 0 | 0 | + | 0 | + | 0 |
| 0,125 % | + | 0 | + | 0 | ++ | 0 | ++ | 0 |
| 0,250 % | + | 0 | + | 0 | ++ | 0 | ++ | 0 |
| 0,500 % | ++ | + | ++ | 0 | +++ | 0 | +++ | 0 |
| 1,0 % | +++ | ++ | +++ | + | +++ | + | +++ | ++ |
| Tampon phosphate . . . | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

*Légende:* + = élaboration de pigment
0 = absence de pigment

Il ressort du tableau I que les 4 souches testées ont élaboré le pigment; on observe que le milieu de culture à la glycérine s'est avéré supérieur au milieu avec glucose, probablement à cause d'une acidification rapide en présence de cette héxose qui inhibe le développement et implicitement l'apparition du pigment, fait constaté en 1936 par GOLDSWORTHY et STILL qui ont remarqué que le glucose ajouté au milieu en proportion de 1% inhibe la production du pigment chez le *Serratia marcescens*. L'emploi d'une solution aqueuse d'acide glutamique a donné des résultats identiques en ce qui concerne la production du pigment; néanmoins, autour du cylindre on observe d'abord l'apparition d'une zone d'inhibition, ensuite d'un anneau de croissance plus accentué. Les zones d'inhibition, ainsi que les zones de croissance plus marquées qui apparaissent à la périphérie des premières, seraient dues aux modifications du pH sous l'influence de l'acide glutamique (RENKONEN, 1947). Pour ce qui est des solutions en tampon phosphate pH 7,0 ces zones n'ont jamais été observées auparavant.

Afin de vérifier si l'utilisation de l'acide glutamique dans la synthèse de la prodigiosine se réalise par la formation du noyau pyrrolique, on a synthétisé, selon la technique d'ABDERHALDEN et SCHWAB (1926), une forme isomère de l'acide pyrrolydon carbonique, l'acide α — oxypyrrolin — α' carbonique (voir formule 2); la pureté de cette substance a été vérifiée par la détermination du point de fusion et par chromatographie sur papier.

Par l'emploi de la méthode de diffusion en agar, pour la mise en évidence de la pigmentogénèse et de la valeur du milieu de culture A, comme substratum, on a obtenu en présence de l'acide α — oxypyrrolin — α' carbonique l'élaboration de pigment rouge caractéristique pour les souches de *Serratia marcescens*.

Les résultats obtenus nous ont déterminés à étendre nos recherches à d'autres substances qui, théoriquement, ont la possibilité de former un noyau pyrrolique, c'est-à-dire qui possèdent dans leur molécule 4 atomes de charbon liés en chaîne avec un atome d'azote situé à l'extrémité de la chaîne. En parallèle, on a également testé une série d'autres substances dont la molécule contient du carbone et de l'azote, mais dans un arrangement différent. Pour ces tests on a employé la technique décrite, utilisant comme substratum le milieu de culture A. Les résultats sont exposés dans le tableau II.

*Tableau II*

**Elaboration du pigment chez le *Serratia marcescens* en présence de substances qui, théoriquement, permettent la formation de noyaux pyrroliques et de substances qui, théoriquement, ne permettent pas la formation de noyaux pyrroliques** ( **solution** $\frac{M}{20}$ )

| Substances | Milieu de culture A — Souches 1 | 2 | $LM_1$ | $LM_2$ | Observations |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. Acide glutamique | + | + | + | + | |
| 2. Glycocolle | + | + | + | + | |
| 3. Glutamine | + | + | + | + | |
| 4. Proline | + | + | + | + | |
| 5. Oxyproline | + | + | + | + | substances qui, théoriquement, |
| 6. Sérine | + | + | + | + | permettent la formation d'un an- |
| 7. Acide γ-aminobutyrique | + | 0 | + | + | neau pyrrolique. |
| 8. Leucine | + | 0 | + | + | |
| 9. Norvaline | + | 0 | + | + | |
| 10. Asparagine | + | 0 | 0 | + | |
| 1. Oxalate d'ammonium | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 2. Malonate d'ammonium | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 3. Succinate d'ammonium | ± | 0 | 0 | ± | |
| 4. Succinate de sodium | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 5. Glutamate d'ammonium | 0 | 0 | 0 | 0 | substances qui, théoriquement, |
| 6. Adipate d'ammonium | 0 | 0 | 0 | 0 | ne permettent pas la formation |
| 7. Pimelate d'ammonium | 0 | 0 | 0 | 0 | d'un anneau pyrrolique |
| 8. Acide α-céto-glutarique | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 9. Valline | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 10. Norleucine | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 11. Lysine | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 12. Hystidine | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 13. Phényl-alanine | ± | 0 | 0 | 0 | |
| 14. β-alanine | ± | 0 | 0 | 0 | |

*Légende:* + = production de pigment
0 = absence de pigment
± = production de pigment dans certaines épreuves et non-production dans d'autres.
*Obs.* — La culture s'est développée dans tous les cas (même où il n'y a pas eu d'élaboration de pigment)

Il ressort du tableau II, que les substances, qui théoriquement permettent la formation d'un anneau pyrrolique, ont également permis la synthèse de la prodigiosine par les souches de *S. marcescens*, à quelques exceptions près. Ainsi la souche 2, en présence de la norvaline, leucine, asparagine et acide γ -amino-butyrique et la souche $LM_1$, en présence de l'asparagine, n'élaborent pas de prodigiosine, ce qui prouve que dans le mécanisme de synthèse du pigment, les souches peuvent se comporter différemment.

Afin de vérifier si l'élaboration de pigment dans un substratum donné est spécifique ou si le substratum respectif est employé aussi comme source de carbone dans le processus métabolique — le soi-disant « metabolic pool » — pendant lequel peuvent se former différents précurseurs du pigment, on a étudié la capacité d'une série des substances mentionnées à servir comme unique source de carbone.

A cet effet, on a utilisé le milieu de culture A, exempt de source de carbone (la glycérine), en introduisant dans les cylindres montés les substances à étudier. En fonction du développement des souches on a pu constater si la substance utilisée sert en même temps au processus métabolique; dans ce cas, le développement des souches montre que l'utilisation de la substance n'est pas spécifique pour la synthèse du pigment. (Tableau III).

*Tableau III*

**Utilisation de différents substratums comme seule source de carbone. Milieu de culture A, sans glycérine**

| Substances | Souche | | |
|---|---|---|---|
| | 1 | $LM_1$ | $LM_2$ |
| 1. Norvaline | 0 | 0 | 0 |
| 2. Leucine | 0 | 0 | 0 |
| 3. Glycocolle | 0 | 0 | 0 |
| 4. Acide γ-amino-butyrique | 0 | 0 | 0 |
| 5. Sérine | 0 | 0 | 0 |
| 6. Asparagine | 0 | + | + |
| 7. Glutamine | 0 | + | + |
| 8. Acide aspartique | 0 | + | + |
| 9. Acide glutamique | + | + | + |
| 10. Lysine | 0 | 0 | + |
| 11. Hystidine | + | + | + |
| 12. Norleucine | 0 | 0 | + |

## DISCUSSION ET CONCLUSIONS

L'emploi de la méthode de diffusion, exposée dans le présent travail, a permis de mettre en évidence le rôle joué par l'acide glutamique, ainsi que par d'autres aminoacides, dans la synthèse de la prodigiosine. Par sa simplicité et les quantités réduites de substances qu'elle nécessite, la méthode s'impose pour l'étude de la pigmentogénèse bactérienne. Les résultats obtenus par nous démontrent la haute capacité de synthèse de la prodigiosine par le *Serratia marcescens*, à partir

de différents aminoacides, qui possèdent le même arrangement des atomes de carbone et d'azote.

On observe une différence entre le comportement des differentes souches de *Serratia marcescens* étudiées, en ce qui concerne la capacité de synthétiser la prodigiosine à partir de différents aminoacides. Selon nos expériences, certaines souches ne sont pas capables d'utiliser tous les aminoacides qui possèdent dans leur molécule 4 atomes de carbone et 1 atome d'azote, disposés en chaîne. Ainsi, la souche 2 ne produit pas de pigment en présence de la norvaline, leucine, asparagine et acide γ -amino-butyrique comme substratum, substances qui possèdent pourtant cet arrangement moléculaire; de même, la souche $LM_1$ n'élabore pas de pigment à partir de l'asparagine. Afin de préciser la cause de ces différences de comportement, il est nécessaire que l'étude soit effectuée sur un plus grand nombre de souches.

Dans la synthèse de la prodigiosine, la première étape est constituée par la formation du noyau pyrrolique, suivie par la liaison par 3 des noyaux formés. Dans le cas de l'acide glutamique, il existe une étape intermédiaire dans la formation du noyau pyrrolique, constituée probablement par l'obtention de l'acide α -pyrrolidin- α' carbonique.

Selon nos données, l'acide glutamique, la glutamine, l'acide aspartique et l'asparagine, substances qui permettent la formation de pigment, sont également utilisées comme source de carbone et, par conséquent, participent egalement au processus métabolique général. Par contre, la norvaline, la leucine, le glycocolle, l'acide γ-amino-butyrique et la sérine ne sont pas utilisés comme source de carbone et, par conséquent, l'emploi de ces substances comme substratum pour la synthèse du pigment semble être un phénomène spécifique.

BIBLIOGRAPHIE

1. Abderhalden E. et Schwab E. Z. — Zt. physiol. Chem., 1926, **153**, 88.
2. Goldsworthy E. N. et Still J. L. — J. Path. a. Bact., 1936, **43**, 565.
3. Green J. S., Rappaport D. A. et Williams P. R. — J. Bact., 1956, **72**, 483.
4. Hubbard R. et Rimington C. — Biochem. J., 1950, **45**, 220.
5. Mesrobeanu L. et Paunesco E. — Fiziologia microbiană, Ed. Acad. R.P.R., 1960.
6. Purkayasha M. et Williams R. P. — Nature, London 1960, **187**, 349.
7. Renkonen K. — Ann. Inst. Pasteur, 1947, **73**, 933.
8. Shemin D. et Rittenberg D. — J. Biol. Chem., 1945, **159**, 567.
9. Shemin D. et Rittenberg D. — J. Biol. Chem. 1946, **166**, 621.
10. Weiss M. C. — J. Cell comp. Physiol., 1949, **34**, 467.
11. Williams P. R. — Bact. Rev., 1956, **20**, 282.
12. Wrede F. et Hettche E. — Zt. f. Hyg. 1930, **111**, 121.

## К ИЗУЧЕНИЮ МЕХАНИЗМА СИНТЕЗИРОВАНИЯ ПРОДИГИОЗИНА ШТАММАМИ SERRATIA MARCESCENS

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

В настоящей работе изучалась возможность получения пигмента, образуемого 4-мя штаммами *Serratia marcescens* из глютаминовой кислоты.

Установлена возможность синтезирования пигмента на данной основе, повидимому, путем закрытия пиролового ядра; из молекулы глютаминовой кислоты полу-

чается молекула пиролидон — углекислоты, служащая в качестве посредника при синтезировании трипирилметана — красного пигмента, вырабатываемого данными бактериями. Установлено также, что и ряд других аминокислот, обладающих 4-мя атомами углерода и одним атомом азота на конце цепи, способны обусловить образование пигмента. Изучали также ряд других веществ, содержащих углерод и азот в молекуле, но не обладающих вышеуказанным расположением; установлено что такие вещества, неспособные теоретически к образованию пиролового ядра, не обуславливают образования пигмента.

Часть веществ, обусловивших появление пигмента, не служат в качестве источника углерода и повидимому специфически участвуют в образовании пигмента.

Пользовались способом диффузии, применяя твердую синтетическую среду, на которой возможен рост штаммов но не возможно образование пигмента. Исследуемые основы добавлялись к данной твердой среде путем диффузии вокруг стеклянных цилиндров. Способ оказался простым и дающим возможность получать воспроизводимые результаты.

## BEITRÄGE ZUM STUDIUM DES MECHANISMUS DER PRODIGIOSINSYNTHESE DURCH *SERRATIA MARCESCENS*


### ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit würde die Möglichkeit das von 4 Stämmen von *Serratia marcescens* aus Glutaminsäure gebildete Pigment zu erhalten untersucht.

Es wurde festgestellt, dass das Pigment aus diesem Substrat synthetisiert werden kann. Die Synthese findet wahrscheinlich durch Schliessung eines Pyrrolringes statt, wobei aus einem Molekül Glutaminsäure ein Molekül Pyrrolidonkarbonsäure entsteht, die eine Zwischenstufe in der Bildung des Tripyrrylmethans, also des von diesen Keimen synthetisierten Pigments darstellt. Es konnte festgestellt werden, dass auch gewisse andere Aminosäuren mit 4 Kohlenstoffatomen und einem Stickstoffatom am Ende der Kette zur Pigmentbildung Anlass gehen können. Eine Reihe anderer, Kohlenstoff und Stickstoff in ihrem Molekül enthaltende Verbindungen, die jedoch nicht diese Reihenfolge aufweisen, wurde gleichfalls untersucht. Dabei ergab sich, dass diese Verbindungen, die theoretisch die Bildung eines Pyrrolkernes nicht zulassen, auch keine Pigmentbildung veranlassen.

Ein Teil der Stoffe, die zum Auftreten von Pigment Anlass geben, werden nicht als Kohlenstoffquelle verwendet und scheinen spezifisch in die Pigmentbildung einzugreifen.

Es wurde eine Diffusionsmethode angewendet, die in der Benützung eines festen, synthetischen Nährbodens besteht, der das Wachstum der Stämme von *Serratia marcescens*, nicht aber die Pigmentbildung gestattet. Die zu untersuchenden Substrata wurden diesem festen Nährboden durch Diffusion um Glaszylinder zugesetzt. Die Methode erwies sich als leicht durchführbar und ergibt reproduzierbare Resultate.


## CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF THE MECHANISM OF PRODIGIOSINE SYNTHESIS BY *SERRATIA MARCESCENS*


### SUMMARY

In the present work the possibility was investigated of obtaining the pigment formed from glutamic acid by 4 strains of *Serratia marcescens*.

It was found that the pigment may be synthetized from this substrate. The synthesis is probably achieved by the closing of a pyrrole ring, one molecule of glutamic acid yielding one molecule of pyrrolidone-carbonic acid which is used as an intermediate compound in the synthesis of tripyrrilmethane, i.e. of the red pigment formed by these germs. Several other amino-acids containing 4 carbon atoms and one nitrogen atom at the end of the chain were likewise found to be apt to determine the appearance of the pigment. Further investigations of a series

of other compounds containing carbon and nitrogen in their molecule but displaying a different structure, showed that these compounds which theoretically do not allow of pyrrole ring formation fail to determine the appearance of pigment.

Some of the compounds determining pigment formation are not used as carbon sources and appear specifically to interfere in pigmentogenesis.

A diffusion method was applied, consisting in the utilization of a solid synthetic medium which permits the growth of *Serratia marcescens* strains but does not permit pigment formation. The substrata to be investigated were added to this solid medium by diffusion around glass cylinders. The method proved to be simple and yielded reproductible results.

# PREPARAREA SERULUI HEMOLITIC ANTI-OAIE PE COBAI ȘI EXPERIMENTAREA LUI IN REACȚIA BORDET-WASSERMANN

de

MARIA SORESCO, ECATERINA STĂNICĂ și CECILIA STOIAN

*(Lucrare a Institutului «Dr. I. Cantacuzino» — Serviciul de Produse Biologice)*

— Manuscris primit la 12 mai 1960 —

Reacția de fixare a complementului, imaginată în 1901 de BORDET și GENGOU, și-a găsit o foarte largă aplicare în sero-diagnosticul maladiilor infecto-contagioase.

Astfel, WASSERMANN, NEISSER și BRUCK au aplicat cu mult succes această reacție pentru diagnosticul sifilisului.

In decursul timpului, reacția originală Bordet-Wassermann a suferit numeroase modificări, pe de o parte în scopul simplificării ei, iar pe de altă parte pentru a i se mări sensibilitatea.

Unii autori au adus modificări în reacția Bordet--Wassermann cu ser inactivat. Alții au căutat să folosească hemolizinele naturale anti-oaie ale serului uman (HECHT, LEVADITI-LATAPIE, MUTTERMILCH, WEINSTEIN-REZNIKOVA, NARZISSOV și BRAIȚEV). In aceste metode serul bolnavului furnizează atît amboceptorul hemolitic cît și complementul; ele aduc o simplificare a reacției, însă prezintă inconvenientul că, odată cu creșterea sensibilității, scade specificitatea reacției datorită faptului că alexina și hemolizina anti-oaie se găsesc în cantități diferite sau chiar pot lipsi.

Pentru a simplifica metoda originală Wassermann, care întrebuințează ca ser hemolitic anti-oaie serul iepurilor imunizați cu globule roșii de berbec și ca sursă de alexină serul proaspăt de cobai, RUBINSTEIN recomandă prepararea serului hemolitic anti-oaie pe cobai.

Prin trei injecții intraperitoneale a 1 ml de globule roșii de oaie, la patru zile interval, se obține un ser hemolitic puternic începînd din a 8-a zi după ultima injecție, ser care se conservă mult timp «in vivo». Mai mult, RUBINSTEIN constată că anticorpul trece și la animalele din altă generație, încît a putut utiliza serurile noii generații, fără a fi nevoie să recurgă la noi injecții preparante.

În același timp cu alexina, cobaii preparați dau o sensibilizatrice hemolitică extrem de activă. Serurile lor diluate provoacă o hemoliză perfectă. Acest procedeu înlocuiește întrebuințarea separată a celor 2 seruri: alexină de cobai și sensibilizatrice de iepure anti-oaie. Cei doi anticorpi sînt de tărie comparabilă și titrarea acestor seruri este foarte simplă.

MATERIAL ȘI METODĂ

Prepararea serului hemolitic anti-oaie pe cobai s-a făcut pe 4 loturi de cîte 10 animale. Li s-a inoculat de 4 ori la 3 zile interval cîte 1 ml hematii de oaie, spălate și readuse la volum, iar după 10 zile dela ultima inoculare s-a recoltat sînge prin puncție cardiacă și s-a procedat la titrarea hemolizinei și alexinei.

Titrul hemolizinei de cobai (după metoda clasică: inactivarea serului de cobai timp de 30 minute la 56°C) a fost la un lot 1:100, iar la alt lot 1:60.

Titrul alexinei a fost determinat la fiecare ședință de lucru și a variat între 0,15 și 0,35 în funcție de răspunsul animalelor în raport cu anotimpul (mai scăzut iarna).

S-a urmărit și influența alimentației deficiente asupra producerii de alexină-hemolizină pe un lot de cobai, obținîndu-se scăderea titrului hemolitic dela 1/100 la 1/8, adică de 12,5 ori, iar a titrului alexinei de la 0,15 la 0,50 adică de 3,3 ori.

Dăm mai jos schema de titrare a hemolizinei și alexinei de cobai:

I

| Nr. tubului | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ser cobai dil. 1/10 | 0,05 | 0,10 | 0,15 | 0,20 | 0,25 | 0,30 | 0,35 | 0,40 | 0,45 | 0,50 | — |
| Ser fiziologic | 0,95 | 0,90 | 0,85 | 0,80 | 0,75 | 0,70 | 0,65 | 0,60 | 0,55 | 0,50 | 1 |
| Susp. de hematii de berbec 1,5% (din culot) | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 |

30 minute baie Marie 37°

II

*Schema reacției*

| Nr. tubului | 1 | 2 |
|---|---|---|
| Ser de cercetat inactivat 30 minute la 56° | 0,10 ml | 0,15 ml |
| Antigen B-Ruelens dil. 1: 20 | 0,15 ,, | — |
| Ser de cobai după titrul zilei de ex. | 0,20 ,, | 0,20 ,, |
| Ser fiziologic | 0,55 ,, | 0,65 ,, |
| | 45 minute la baie Marie 37° | |
| Suspensie de hematii de berbec spălate 1,5% (din culot) | 0,50 | 0,50 |

Pentru a urmări valoarea hemolitică a acestui produs el a fost utilizat în efectuarea a 302 reacții de fixare a complementului pentru sifilis, comparativ cu serul hemolitic preparat pe iepure.

Pe aceleași seruri, s-au efectuat paralel și reacțiile de floculare: Citochol și Meinicke (M.K.R. II).

Serurile proveneau din diferite servicii, de la 82 bolnavi de lues în diferite faze, bolnavi cu alte afecțiuni cutanate, febrili, precum și de la indivizi sănătoși.

REZULTATE

— 246 seruri au fost negative atît cu hemolizina de cobai cît și cu cea de iepure — concordanță 100%.

— 44 seruri au fost pozitive atît cu hemolizina de cobai cît și cu cea de iepure — concordanță 100%.

— 12 seruri au prezentat următoarele discordanțe:

— în 2 cazuri reacția Bordet-Wassermann clasică, efectuată cu serul hemolitic de iepure, a fost mai intensă cu două cruci;

— în 4 cazuri reacția Bordet-Wassermann clasică, a fost pozitivă cu o cruce, iar cea cu hemolizina de cobai cu două sau trei cruci;

— în 6 cazuri reacția Bordet-Wassermann clasică, efectuată cu ser hemolitic de iepure a fost negativă, iar cea efectuată cu hemolizina de cobai a fost pozitivă, cu o cruce sau 2.

Reacțiile de floculare Citochol și Meinicke au fost deasemeni pozitive. Aceste seruri proveneau de la bolnavi cu lues latent sau cu lues în curs de tratament.

**Tabel cu rezultate discordante**

| No. curent al serului | Reacția B-W clasică | Reacția B-W cu hemolizină de cobai | Reacția Citochol | Reacția Meinicke | Diagnostic clinic |
|---|---|---|---|---|---|
| 6 | — | ++ | ++± | +++ | Lues |
| 14 | — | + | ++ | +++ | Lues latent tratat |
| 29 | +++ | + | — | +++ | Lues I |
| 97 | ++ | +++ | +++ | +++ | Lues în tratament |
| 107 | — | + | + | +++ | Lues latent |
| 120 | — | ++ | +++ | +++ | Lues latent din 1937 |
| 190 | +++± | ++ | +++ | ++++ | Heredo-lues |
| 243 | — | +± | +± | +++ | Lues în curs de tratament |
| 246 | — | + | — | ± | Lues latent tratat |
| 250 | +± | +++ | +++ | +++ | Lues |
| 251 | ± | ++ | +++ | +++ | Lues |
| 288 | ± | +++± | +++ | ++++ | Lues |

CONCLUZII

Pentru sero-diagnosticul luesului am simplificat metoda originală Bordet-Wassermann, folosind în reacție serul hemolitic anti-oaie preparat pe cobai. Acest ser, aducînd în reacție, atît alexină cît și hemolizină, înlocuește pe cele două (hemolizina și alexina) cu o singură titrare a serului de cobai anti-oaie, în care sistemul hemolitic este înlocuit cu o simplă suspensie de hematii de berbec, spălate.

Urmărind valoarea serului hemolitic anti-oaie preparat pe cobai, comparativ cu a serului preparat pe iepuri, prin efectuarea a 302 reacții Bordet-Wassermann în seruri din care 82 proveneau dela bolnavi cu lues în diferite faze ale acestei infecțiuni, efectuîndu-se în paralel și reacțiile de floculare Citochol și M.K.R. II, s-au obținut în general rezultate similare.

Au fost constatate şi cîteva mici discordanţe, care au dovedit totuşi o sensibilitate ceva mai ridicată a reacţiilor efectuate cu ser de cobai anti-oaie (68,97% faţă de 60,97%).

In ceea ce priveşte specificitatea acestei reacţii verificată pe restul de 240 seruri considerate martori, provenite de la persoane sănătoase, de la persoane suferind de diferite afecţiuni dermatologice, febrili sau gravide, nu am constatat nici un rezultat pozitiv nespecific.

BIBLIOGRAFIE

1. Braitev A. — Vestnik venerol. i dermatol., 1953, **3**, 34.
2. Culegeri de instrucţiuni pentru metodele microbiologice de cercetare — Medghiz, 1944.
3. Demanche R. — Précis de technique du sérodiagnostic de la syphilis. Paris, Doin, 1952.
4. Diacono H. şi Rivemale I. — Ann. de Biol. Clinique, 1957, No. **7—9**, 431.
5. Nartisov N. — Vestnik venerol. i dermatol., 1952, **6**, 34.
6. Nicolau S. şi Dănilă P. — Serologia sifilisului, Bucureşti, Ed. Medicală, 1958.
7. Predtecenschii V. E., Borovskaia V. M. şi Margolina L. T. — Metode de laborator clinic. Bucureşti, Ed. de Stat, 1953.
8. Rubinştein M. — Traité pratique de sérologie et de sérodiagnostic. Paris, Maloine, 1932.
9. Sinai G. şi Birgher O. — Diagnosticul microbiologic al bolilor infecţioase. Moscova, Medghiz, 1949.
10. Wadsworth A., Maltaner E. şi Maltaner F. — J. Immunol., 1931, **21**, 313.

## ПРИГОТОВЛЕНИЕ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ СЫВОРОТКИ ПРОТИВ ОВЦЫ НА МОРСКИХ СВИНКАХ И ЕЕ ИСПЫТАНИЕ В РЕАКЦИИ БОРДЕ-ВАССЕРМАНА

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

При серо-диагностике сифилиса мы упростили оригинальный метод Борде-Вассермана, применяя в реакции гемолитическую сыворотку против овцы, приготовленную на морских свинках.

Ввиду того, что эта сыворотка приносит в реакцию как алексин, так и гемолизин, она дает возможность заменить два титрования (гемолизин и алексин) одним единственным титрованием сыворотки морской свинки против овцы, при котором гемолитическая система заменяется простой взвесью отмытых эритроцитов.

При изучении полноценности гемолитической сыворотки против овцы, приготовленной на морских свинках, сравнительно с сывороткой приготовленной на кроликах, путем проведения 302 реакций Борде-Вассермана с сыворотками среди которых 82 происходили от больных в разных фазах сифилиса и сопоставляя параллельно также и реакции флокуляции — Цитохоль и М.К.Р. II, получены в общем сходные результаты.

Отмечены также небольшие несоответствия, доказавшие более высокую чувствительность реакций проведенных с сывороткой морских свинок против овцы (68,97% по сравнению с 60,97%).

При изучении специфичности реакции, проверенной на остальных 240 сыворотках, считаемых контролями, происходящих от лиц здоровых, больных разными дерматологическими заболеваниями, лихорадящих лиц или беременных женщин, не отмечен ни один неспецифический результат.

## LA PRÉPARATION DU SÉRUM HÉMOLYTIQUE ANTI-MOUTON SUR COBAYES ET SON APPLICATION DANS LA RÉACTION BORDET-WASSERMANN

RÉSUMÉ

On a simplifié la méthode originale de Bordet-Wasesrmann pour le sérodiagnostic de la syphilis, utilisant dans la réaction du sérum anti-mouton préparé sur cobayes. Par ce sérum, qui contient à la fois l'alexine et l'hémolysine, on a remplacé le double titrage de l'hémolysine et de l'alexine par un seul titrage: celui du sérum de cobaye anti-mouton, où le système hémolytique est substitué par une simple suspension d'hématies lavées de mouton.

La valeur du sérum hémolytique préparé sur cobayes, étudiée comparativement avec la valeur du sérum préparé sur lapins, s'est avérée en général égale, dans les 302 réactions Bordet-Wassermann, effectuées avec des sérums dont 82 provenaient de malades de syphilis, en différentes phases; par les réactions de floculation, Cytochol et M.K.R. II, on a également obtenu des résultats similaires.

Les quelques discordances constatées, ont démontré une sensibilité un peu plus marquée des réactions avec du sérum de cobaye anti-mouton (68,97% vis-à-vis de 60,97%).

En ce qui concerne la spécificité de cette réaction vérifiée sur le reste de 220 sérums, considérés comme témoins, provenant de personnes indemnes, de sujets affectés de différentes affections dermatologiques, fébriles ou gravides, nous n'avons constaté aucun résultat positif non-spécifique.

## DIE HERSTELLUNG EINES HÄMOLYTISCHEN SERUMS FÜR SCHAFBLUTKÖRPERCHEN AM MEERSCHWEINCHEN UND SEINE ERPROBUNG IN DER BORDET-WASSERMANNSCHEN REAKTION

ZUSAMMENFASSUNG

Die ursprüngliche Methode der serologischen Luesdiagnostik nach Bordet-Wassermann wurde durch die Verwendung eines vom Meerschweinchen gewonnenen haemolytischen Serums für Schafblutkörperchen vereinfacht.

Da dieses Serum sowohl Komplement als auch Hämolysin in die Reaktion einführt, können die zwei Auswertungen (des Hämolysins und des Komplements) durch eine einzige Auswertung des hämolytischen Meerschweinchenserums ersetzt werden. Dabei wird anstatt des hämolytischen Systems eine einfache Aufschwemmung gewaschener Schafblutkörperchen verwendet.

Der Wert des hämolytischen Meerschweinchenserums wurde im Vergleich mit Kaninchenambozeptor in 302 Bordet-Wassermanschen Reaktionen erprobt. Zweiundachtzig dieser Seren stammten von Luesfällen in verschisdenen Phasen der Infektion. Gleichzeitig wurden auch Flockungsreaktionen (Citochol und M.K.R. II) ausgeführt. Die Ergebnisse waren im allgemeinen übereinstimmend.

Es gab auch einige diskordante Fälle, die in ihrer Gesamtheit aber eher auf eine etwas grössere Empfindlichkeit der mit hämolytischem Meerschweinchenserum durchgeführte Reaktionen hinweisen (68,97% gegen 60,97%).

Was die Spezifizität der Reaktion betrifft, wurde bei den übrigen, als Kontrollen betrachteten 240 Seren von gesunden Personen, von an Hautkrankheiten oder fieberhaften Erkrankungen leidenden Patienten, oder von Schwangeren, kein einziges unspezifisches positives Ergebnis verzeichnet.

## PREPARATION OF ANTI-SHEEP HAEMOLYTIC SERUM IN THE GUINEA-PIG AND ITS TRIAL IN THE *BORDET-WASSERMANN* REACTION

SUMMARY

The original method of Bordet-Wassermann for the serological diagnosis of syphilis has been simplified by using an anti-sheep haemolytic serum prepared in the guinea-pig.

Since this serum contains both complement and haemolysin, the two titrations (of haemolysin and of complement) are substituted by a single titration of the anti-sheep guinea-pig serum, a suspension of washed sheep cells being used instead of the haemolytic system.

In order to ascertain the value of anti-sheep haemolytic serum prepared in the guinea-pig as compared to sera prepared in rabbits, parallel Bordet-Wassermann tests were carried out with 302 sera, 82 of which were collected from syphilitic patients in various stages of the disease. Floculation tests (Citochol and M.K.R. II) were performed at the same time. On the whole, concordant results were obtained.

A few discordant results appear to point to a slightly higher sensitivity of the reactions performed by means of anti-sheep guinea-pig serum (68.97 per cent as against 60.97 per cent).

As regards the specificity of the reaction, none of the rest of 240 control sera collected from healthy subjects, from patients suffering from various skin diseases or feverish conditions, and from pregnant women gave a nonspecific positive result.

# OBSERVATIONS BIOCHIMIQUES ET SÉROLOGIQUES SUR 240 SOUCHES DE *SH. FLEXNERI* TYPE 2. ÉTUDE DE LA STRUCTURE ANTIGÉNIQUE DE CERTAINES VARIANTES DE PHASE APPARUES SPONTANÉMENT

par

A. Gorea et T. Meitert

*(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service de la Dysenterie)*

— Manuscrit reçu le 9 avril 1960 —

La grande incidence de la *Sh. flexneri* 2*a* dans l'étiologie de la dysenterie bacillaire en Roumanie, l'isolement des souches atypiques qui pourraient surtout être des variantes de ce type, de même que les limites des caractères biochimiques (notamment fermentatifs) qui varient d'une classification à l'autre, nous ont déterminés à étudier ce type de variantes du point de vue biochimique et sérologique.

Les recherches ont été faites sur un nombre de 240 souches de type 2 isolées des malades. Au moment de cette étude les souches étaient âgées de quelques mois à un an et demi; elles ont subi pendant ce temps environ 2—8 passages sur gélose droite 0,5%. A cette occasion nous avons incidemment remarqué des relations antigéniques avec les souches de *Sh. flexneri* type 5 qui ont ultérieurement servi de point de départ à une étude antigénique des souches de ce type.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

*Souches*: 240 souches de *Sh. flexneri* type 2 (216 type 2a, 15 type 2b et 9 type 2 non-déterminé n'agglutinant pas avec les sérums de groupe) isolées pendant les années 1954—1955 de différentes régions du pays, la souche *Sh. flexneri* type 5 G541-Buzeu, ainsi que les souches de type des collections SARTORIUS et WEIL.

*Les caractères* S et R furent recherchés par: le test d'agglutination acide (8), le test SEPPILLI-VENDRAMINI (14), la coloration des colonies au cristal violet (7), le test PAMPANA. La grande majorité des souches étaient de phase « SO ».

*La fermentation des sucres* a été recherchée sur des cultures cultivées sur eau peptonée 1%, sucre 1% avec bleu bromthymol 12% (sol. 0,2%) comme indicateur, maintenues 30 jours à 37°C.

*La présence de l'indol* a été contrôlée à l'aide du réactif KOVACS en culture de 48$^{h}$ sur eau peptonée 1%.

*Les sérums agglutinants* ont été préparés sur lapins de 2—3 kg par inoculations intraveineuses de germes vivants en concentrations progressives.

*Les sérums absorbés spécifiques* de type ou de groupe ont été préparés selo la méthode classique de CASTELLANI.

*La pathogénicité* des souches a été établie par le test de SERÉNY (19)

## RÉSULTATS

I. *Comportement biochimique.* Toutes les souches étudiées ont ferment le glucose et l'arabinose. Aucune n'a fermenté l'adonite, la salicine, l'inosite e le lactose, aucune n'a produit de gaz.

La plus importante différenciation a été obtenue à l'aide du: mannitol rhamnose, maltose et dulcite (Tableau I).

*Tableau*

**La distribution des souches *Sh. flexneri* 2a, selon la fermentation des sucre (mannitol, rahmnose, maltose, dulcite)**

| Type biochimique | Mannitol | Rhamnose | Maltose | Dulcite | Souches | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Nombre | % |
| I | + | + | 0 | 0 | 73 | 30,4 |
| II | + | + | + | 0 | 52 | 21,7 |
| III | + | + | 0 | + | 36 | 15 |
| IV | + | + | + | + | 18 | 7,5 |
| V | + | 0 | 0 | 0 | 8 | 3,3 |
| VI | + | 0 | + | 0 | 9 | 3,7 |
| VII | + | 0 | 0 | + | 6 | 2,5 |
| VIII | + | 0 | + | + | 4 | 1,6 |
| IX | 0 | + | 0 | 0 | 8 | 3,3 |
| X | 0 | + | + | 0 | 10 | 4,1 |
| XI | 0 | + | 0 | + | 6 | 2,5 |
| XII | 0 | + | + | + | 4 | 1,6 |
| XIII | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1,2 |
| XIV | 0 | 0 | + | 0 | 3 | 1,2 |
| | | | | TOTAL | 240 | 100 |

Du tableau I il résulte que la majorité des souches (179, représentant 74,6% sont comprises dans les premiers quatre groupes biochimiques, étant en même temps mannito-rhamnoso-positives. Nous constatons que de toutes les souches 206 (86%) sont mannitol-positives, 207 (86,5%) rhamnose-positives et 10 (41,6%) maltose-positives. Contrairement à l'opinion de KAUFFMANN (10) nou constatons que 30,8% des souches ont fermenté la dulcite.

En ce qui concerne la production de l'indol, seulement 14,5% des souche ont donné une réaction positive.

Sous le rapport du type sérologique les souches mannitol-rhamnoso-positive sont réparties conformément aux données du tableau II. Le reste des souche (mannitol ou rhamnoso-négatives) appartenaient en grande majorité au typ 2a et très rarement au type 2 non-déterminable.

*Tableau II*

**La distribution des sous-types sérologiques dans les quatre premières catégories biochimiques**

| Catégorie biochimique | Sous-type sérologique | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 2a | | 2b | | 2 * | |
| | Nombre | % **) | Nombre | % | Nombre | % |
| I | 63 | 40,1 | 8 | 53,3 | 2 | 28,5 |
| II | 46 | 29,3 | 3 | 20,0 | 3 | 42,8 |
| III | 32 | 20,3 | 3 | 20,0 | 1 | 14,2 |
| IV | 16 | 10,1 | 1 | 6,7 | 1 | 14,2 |

*) Souches de type II non-agglutinables par les sérums de groupe
**) % du total des souches appartenant au même type sérologique.

Un comportement inaccoutumé a été constaté chez un nombre réduit de souches vis-à-vis de certains sucres qui ne sont pas fermentés habituellement par les souches de *Sh. flexneri* type 2. Ainsi 15 souches (6,2%) ont fermenté le saccharose; 4 souches (1,6%) la sorbite et 4 souches (1,6%) le xylose.

II. *Comportement sérologique. Variation de phase des souches 2a.* Les 240 souches de *Sh. flexneri* de type 2a ont été distribuées en rapport avec leurs comportements vis-à-vis des sérums agglutinants absorbés, de type et de groupe, ainsi qu'il résulte du tableau III.

*Tableau III*

**Le comportement sérologique au moment de l'isolement des 240 souches de *Sh. flexneri* type 2 (agglutinations sur lame)**

| Nombre des souches | Sérums absorbés de: | | | Sous-type sérologique | Pourcentage du total des souches |
|---|---|---|---|---|---|
| | Type II | Groupe 3, 4 | Groupe 7, 8, 9 | | |
| 216 | + | + | − | 2a | 90 |
| 15 | + | − | + | 2b | 6,2 |
| 9 | + | − | − | 2 | 3,7 |

Les 9 souches agglutinées seulement par le sérum II font partie probablement de la catégorie des souches de type 2a signalées par SEELIGER (18) et qui contiennent la fraction antigénique de groupe 3,4 sous forme de haptide (c'est-à-dire incapable de déterminer l'agglutination des germes avec le sérum correspondant, mais capable de déterminer des anticorps homologues dans le sérum de l'animal).

On a pu observer ultérieurement une variation spontanée de phase chez 10 des souches de type 2a. Afin d'illustrer ce phénomène nous présentons les résultats des recherches faites sur trois souches type 2a dont deux ont subi cette variation antigénique. Ces souches portent respectivement les symboles suivants: 36/56, 318/56, et 13078/55. Nous avons utilisé, en outre, la souche G541 et la souche *G. Sartorius* (les deux de type *Sh. flexneri* 5).

Du point de vue morphologique et culturel toutes ces souches ont été en phase « so ». En plus, les souches 2a et leurs variantes déterminaient aux cobayes une kérato-conjonctivite. Cette qualité ne pouvait être exigée des souches G541 et *G. Sartorius* maintenues depuis trop longtemps dans le laboratoire au moment des recherches. Le comportement sérologique de ces souches se trouve dans le tableau IV.

*Tableau* IV

**Comportement sérologique des souches 36/56, 318/56, 13078/55, G541 et *G. Sartorius***

| Souche | Sérums absorbés | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | II | V*) | V**) | 3,4 | 7, 8, 9 |
| 36/56 | + | — | — | + | — |
| 318/56 | x***) | — | + | + | — |
| 13078/55 | — | — | + | — | — |
| G541 | — | + | + | — | — |
| *G. Sartorius* | — | + | + | — | + |

*) Le sérum a été préparé avec la souche *G. Sartorius*
**) Le sérum a été préparé avec la souche G541
***) La souche était agglutinable ou non-agglutinable d'un passage à l'autre.

Ainsi qu'il résulte de ce tableau, à mesure que la souche type 2a perd l'antigène de type II elle commence à être agglutinée par le sérum type V, préparé avec la souche G541. Cette agglutination devient encore plus marquée si la variante a perdu aussi ses antigènes de groupe 3,4. Les suspensions de ces cultures inactivées à 60°C (pendant 30′) présentent le même comportement sérologique.

Les sérums préparés avec chacune de ces 5 souches, agglutinent réciproquement toutes les autres avec la même intensité en tube, ainsi que sur lame (dilution 1/20).

Dans les figures 1, 2, 3 et 4, nous donnons les résultats des réactions d'agglutination après des absorptions directes et croisées (voir la planche 1)

En tenant compte des formules antigéniques reconnues des souches type

**Schéma antigénique probable des souches 36/56, 318/56, 13078/55, G541**

| Souche | Antigènes spécifiques | Antigène de groupe | Type | Phase antigénique |
|---|---|---|---|---|
| 36/56 | II | 1 1′ 3 4 | 2a | A |
| 318/56 | (II*) | 1 1′ 3 4 10 | 2a | B |
| 13078/55 | — | — 1′ — — 10 | 2a | C |
| G541 | V | 1 — — — 5,10 | 5 | — |

*) peut être présent ou absent

2a (II, 1, 3, 4) et type 5 (V, 1, 5, 7, 9), les données que nous avons obtenues dans les réactions d'agglutination directes et croisées avec les sérums absorbé

et non-absorbés, illustrées par ces 4 figures, nous permettent de proposer les schémas antigéniques des souches étudiées et des variantes du type 2a.

Conformément à ce schéma il existerait au moins trois phases de variation antigénique du type 2a. La phase classique A, contenant l'antigène spécifique de type II, ainsi que les antigènes de groupe 3,4. Dans la phase B il y a tendance à

| Sérum natif Titre 1 | | La souche 36/56 est agglutinée par: | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 36/56 | 318/56 | 13078/55 | 541G |
| | | 12800 | 3200 | 3200 | 3200 |
| Sérum 13078/55 absorbé avec: | 36/56 | | | | |
| | 318/56 | 3200 | | | |
| | 13078/55 | 6400 | 1600 | | 1600 |
| | 541G | 6400 | 800 | 1600 | |

Fig. 1

| Sérum natif Titre 1 | | La souche 318/56 est agglutinée par: | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 36/56 | 318/56 | 13078/55 | 541G |
| | | 6400 | 12800 | 12800 | 3200 |
| Sérum 318/56 absorbé avec: | 36/56 | | 6400 | 3200 | 1600 |
| | 318/56 | | | | |
| | 13078/55 | 800 | 800 | | 3200 |
| | 514G | 3200 | 6400 | 12800 | |

Fig. 2

| Sérum natif Titre 1 | | La souche 13078/55 est agglutinée par: | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 36/56 | 318/56 | 13078/55 | 541G |
| | | 6400 | 12800 | 12800 | 6400 |
| Sérum 13078/55 absorbé avec: | 36/56 | | 3200 | 6400 | 3200 |
| | 318/56 | | | | |
| | 13078/55 | | | | |
| | 541G | 6400 | 6400 | 12800 | |

Fig. 3

| Sérum natif Titre 1 | | La souche G-541 est agglutinée par: | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 36/56 | 318/56 | 13078/55 | 541G |
| | | 1600 | 3200 | 12800 | 6400 |
| Sérum G-541 absorbé avec: | 36/56 | | 800 | 1600 | 1600 |
| | 318/56 | | | | 6400 |
| | 13078/55 | 200 | 200 | | 3200 |
| | 541G | | | | |

Fig. 4

▨ = Saturation complète

*Planche* 1. — Réactions d'agglutination directe et croisée avec les sérums non-absorbés et absorbés des souches: 36/56 (Fig. 1), 318/56, (Fig 2) 13078/55 (Fig. 3), G541 (Fig. 4).

la disparition de l'antigène II spécifique de type, mais sans qu'il soit définitivement perdu; la variante respective est inconstante, sous ce rapport, permettant ou non sa mise en évidence d'un passage à l'autre. Cette phase se caractérise néanmoins par une fraction antigénique de groupe non-décelable, ou seulement

*Tableau V*

**Résultats des agglutinations sur lame des souches de collection de différents types antigéniques avec les sérums monovalents 10 et 1'**

| Sérum | Souches | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Série Kruse | | | | | | | | Série Weil | | | | | | | | | | |
| | A | BC | D | F | G | H | L | X | $Y_1$ | $Y_3$ | I | I—III | II—VII | III—VI | IVgr | IV | VI | VII | VIII |
| $\frac{13078}{36/56}$ =10 | — | +++± | — | +++ | — | +++ | ++± | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | + | +± | +++ | +± | — | +++ | +++ |
| $\frac{13078}{G541}$ =1' | ++± | +++ | +++ | +++ | ± | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | — | +++ | +++ |

inactive du point de vue antigénique dans la phase A, et qui existe de même dans la souche G541 du type 5. Cette fraction a été désignée par nous: antigène 10. La phase C se caractérise par l'absence totale de l'antigène de type II de même que des antigènes de groupe 3,4 gardant exclusivement la fraction antigénique 10 de groupe qui est également commune à la souche G541. Cette fraction antigénique de groupe qui est évidente seulement pour les souches type 2a deviées du point de vue antigénique, paraît être une forme modifiée d'antigène 4 de groupe. Cette supposition nous a été suggérée par le fait que les sérums absorbés ne contenant que des anticorps correspondant à cet antigène (par ex. le sérum 13078 absorbé avec la souche 36/56) agglutinent pratiquement toutes les souches qui conformément au schéma international contiennent l'antigène 4 (Tableau V).

Les résultats des réactions d'agglutination avec les sérums absorbés nous ont imposé la disjonction de l'antigène 1 de groupe en deux fractions distinctes 1 et 1', (voyez le schéma présenté). La fraction 1' a imposé sa présence à la suite du fait que le sérum G541 absorbé avec la souche 13078/55 continue d'agglutiner les souches 36/56 et 318/56 et aussi par le fait que le sérum 36/56 absorbé avec la souche G541 continue d'agglutiner la souche 13078/55. L'agglutination des souches 36/56, 318/56 et 13078/55 par le sérum 13078 absorbé avec la souche G541 vient à l'appui de l'hypothèse sur l'existence de la fraction 1'. Des réactions d'agglutination des diverses souches de collection de différents types antigéniques avec le sérum contenant uniquement des anticorps 1' — le sérum 13078/55 absorbé avec la souche G541 —, il résulte que les souches dépourvues de cette fraction sont exceptionnelles (telles les souches *G. Sartorius* et VI *Weil*).

L'ubiquité de cet antigène (1) plaide également en faveur de l'hypothèse qui considère cette fraction comme une forme modifiée de l'antigène de groupe 1.

Cette variation antigénique spontanée a été subie — ainsi qu'il a été montré — seule-

ment par 10 des 216 souches type 2a (4,6%). Parmi ces souches 7 ont été surprises dans la phase B (3,2%) et trois dans la phase C (1,4%). On n'a pu établir une relation entre le type biochimique et les phases antigéniques A, B, C.

La capacité pathogène des variantes antigéniques pour la cornée des cobayes, est indépendante de la phase dans laquelle elles se trouvent. Isolées à nouveau des yeux des cobayes malades, les souches gardent leur structure antigénique non-modifiée, les variantes de phases B et C ne manifestant aucune tendance à revenir en phase A.

## DISCUSSION

Les recherches faites sur les propriétés biochimiques de 240 souches de type 2 nous ont montré qu'à part les caractères fermentatifs typiques (dont une partie obligatoires) on constate une série de caractères atypiques, qui pourraient éventuellement représenter des particularités régionales des souches étudiées.

En premier lieu nous remarquons la fermentation du rhamnose, chez 86,5% des souches, caractère moins habituel chez les souches étudiées par EDWARDS et absent chez les souches étudiées par KAUFFMANN. On constate en plus que 30,8% des souches ont fermenté la dulcite, caractère qui n'appartient qu'aux *Sh. flexneri* type 6 et souvent aux souches de *Sh. boydii.*

14% des souches examinées étaient mannitol-négatives, fait signalé aussi par d'autres auteurs (20, 6, 12) chez différents sérotypes de *Sh. flexneri* (type 4, type 6, etc.).

La fermentation du saccharose par 6,2% des souches pourrait être due au fait d'avoir été étudiées après environ 1 an d'entretien sur des milieux de culture de laboratoire ce qui conduirait à l'apparition de cette réaction (5, 2, 3).

La fermentation du xylose par un nombre réduit de souches (6,2%) constitue une exception qui, à notre connaissance, n'a été signalée que chez les *Sh. flexneri* type 4 (6).

Les étapes de la variation de phase chez les souches *Sh. flexneri* sont connues depuis les premiers essais de systématisation des caractères antigéniques de ce groupe de germes (15, 7). Elles se succèdent en rapport avec la disparition progressive des antigènes de type ou de groupe. La variation de phase du type 2a étudiée par divers auteurs (1, 21, 18, 15) ne diffère pas des variations que présentent généralement les bacilles *Sh. flexneri.*

Récemment OKABE (13) détermine la variation de certaines souches de ce type en cultivant ces germes en présence de l'antisérum homologue et obtient ainsi, en dehors de la phase antigénique normale-la phase A, avec la formule II, 1, 3, 4 — encore deux phases B et C: la première dépourvue d'antigène II et la seconde dépourvue des antigènes 3, 4. Une phase C semblable a été également isolée par COOPER (4) qui, en employant la lumière oblique, a décelé des colonies dont la morphologie dépendait de la phase antigénique dans laquelle se trouvaient les germes d'origine.

En ce qui concerne les variantes antigéniques que nous avons étudiées, elles se conforment aux modèles décrits antérieurement et apparaissent spontanément au cours de l'entretien sur milieux de culture. En précisant les relations antigéniques entre les trois variantes de phase A, B et C, nous avons établi leur

formule antigénique, constatant à cette occasion que l'antigène, probablement spécifique à la phase C est commun à une fraction antigénique de la souche de *Sh. flexneri* type 5 (souche G541). Pour les raisons indiquées dans cette étude nous l'avons dénommé, provisoirement, antigène 10; il a servi dans nos recherches ultérieures à la disjonction des souches type 5, selon qu'elles possèdent ou non cet antigène.

La relation antigénique entre la phase C de la *Sh. flexneri* 2a et le type 5 a été récemment constatée par METZGER et RUDNICKA (11) qui démontrent pour les souches de phase C la présence du complexe entier d'antigènes de groupe des *Sh. flexneri* 5. Toutefois, de ce point de vue, nos données ne correspondent pas à celles des auteurs cités. Nous avons constaté que la variante de phase C possède à part l'antigène 10 (commun à la souche G 541) pour le moins encore un antigène, commun à la souche originale (phase A) et à la variante de phase B, dénommé par nous antigène 1'. Nous avons prouvé, en même temps, que la fraction 10 commune aux phases B et C de *Sh. flexneri* 2a n'est rencontrée que chez certaines souches de *Sh. flexneri* type 5.

Le problème se pose si une telle variante de phase existe dans la nature et en quelle proportion. La réponse à cette question a été déjà donnée par BOYD (1) qui a montré que les variantes Y sont, en fait, des souches de type 2a ou 4a, qui ont perdu les antigènes de type. Leur isolement des dysentériques démontre non seulement que ces variantes sont créées également dans l'organisme de l'homme, mais qu'elle peuvent être éventuellement pathogènes.

En examinant les statistiques sur l'incidence des types de *Sh. flexneri* on peut observer un phénomène plutôt curieux. Par exemple en Roumanie, où pendant les dernières années plus de 60% des souches de *Sh. flexneri* isolées étaient de type 2a, les variantes Y ont été isolées seulement dans approximativement 0,1% des cas, tandis que les variantes X, que l'on suppose dériver du type 2b (qui a une incidence extrêmement réduite dans notre pays) ont été isolées dans environ 3% des cas. La même remarque peut être déduite aussi d'autres statistiques (11). Les variations du type 2a vers le type X, quoique signalées (5), restent rares. La question se pose de savoir si ces variations n'apparaissent pas plus souvent « in vivo » ou bien si l'apparition des variantes X ne proviendrait d'autres souches que du type 2b. On peut aussi se demander si la variante X ne constitue pas à son tour un « type indépendant ».

En ce qui concerne la pathogénicité des variantes du type 2a, elle a pu être démontrée dans une autre étude (9). La pathogénicité des variantes de phase B ainsi que celle de phase C ont été prouvées par le test de SERÉNY (kérato-conjonctivite des cobayes). Il est vrai que la variante C a déterminé une légère maladie en proportion de un sur dix des cobayes infectés. Mais une fois isolée de ce cobaye, bien qu'elle se maintenant dans la même phase, la variante a déterminé une maladie typique chez tous les cobayes infectés. Ce fait prouve en premier lieu une totale indépendance entre la structure antigènique et le pouvoir pathogène (tant que la souche se trouve dans la phase « SO »). En second lieu il est démontré que les modifications antigéniques progressives évoluent plus ou moins parallèlement avec la perte de la propriété pathogène mais sans en dépendre, se comportant, parfois et dans certaines conditions, comme si elles voulaient signaler la présence de cette propriété. L'indépendance entre la structure antigénique et la pathogénicité ressort d'ailleurs aussi du fait que des souches avec structure

antigénique intacte, perdent quand même, après un certain temps, la capacité de déterminer la kérato-conjonctivite du cobaye.

Toutes ces considérations plaideraient en faveur du fait que les variantes de phase une fois apparues, pourraient entrer directement dans le cycle épidémiologique et que les observations en ce qui concerne leur incidence statistique soient expliquées précisément par cette possibilité. Il ne s'agit certainement pas dans cette hypothèse de la variante de phase C qui, à notre connaissance, n'a jamais été isolée des malades. La supposition que de telles souches échapperaient au contrôle sérologique est improbable, vu qu'elles sont vite agglutinables par l'antisérum polyflexner qui contient habituellement des anticorps antifacteur 10. Il est donc plus que probable que de telles souches soient des variantes de laboratoire qui, en dépit de la dégradation antigénique subie, peuvent manifester leurs caractères pathogènes.

RÉSUMÉ

Un nombre de 240 souches de *Sh. flexneri* type 2 isolées entre 1954—1955, ont été étudiées, du point de vue biochimique et sérologique.

Toutes ont fermenté le glucose et l'arabinose mais n'ont pas fermenté l'adonite, la salicine, l'inosite et le lactose.

La majorité des souches (74,6%) ont fermenté la mannite et le rhamnose, pouvant être encadrées dans quatre types biochimiques en vertu de leurs comportements vis-à-vis du maltose (41,6% souches maltoso-positives) et de la dulcite (30,8% souches dulcito-positives). 14% des souches ont été mannitol-négatives et 13,5% rhamnoso-négatives.

Parmi les autres sucres, le saccharose a été fermenté par 15 souches (6,2%), tandis que la sorbite et le xylose, chacun par 4 souches (1,6%). 14,5% des souches ont été indol-positives.

Des 240 souches qui à l'isolement possédaient de l'antigène II, 216 (90%) étaient du type 2a, 15 (6,2%) du type 2b et 9 (3,7%) ne possédaient pas l'antigène de groupe 3,4 ou 7,8,9.

Par entretien sur milieux de laboratoire 10 souches de type 2a (4,6%) ont subi spontanément une variation de phase qui, d'après nos recherches, évolue en deux étapes: première étape, les souches perdent l'antigène de type spécifique II (phase B); seconde étape, elles perdent l'antigène de groupe 3,4 (phase C). Les souches, se trouvant à la première étape de la variation de phase, mettent en évidence un nouvel antigène de groupe que l'on rencontre également chez certaines souches de type 5 (probablement aussi chez certaines souches d'autre type) et que nous avons dénommé 10.

Des dix souches ayant subi cette variation, 7 (3,2% du total des souches 2a) ont été surprises dans la phase B et 3 (1,4%) dans la phase C.

BIBLIOGRAPHIE

1. Boyd J. S. K. — J. Hyg. (Camb) 1938, **38**, 477.
2. Boyd J. S. K. — Trans. Roy. Soc. Trop. Med., 1940, **33**, 553.
3. Bridges R. F. et Taylor J. — J. Hyg. 1946, **44**, 346.
4. Cooper M. L. Keller, H. M. et Walters Ed. — J. Immunol. 1957, **78**, 160.

5. Edwards R. R. et Ewing W. H. — Identification of Enterobacteriaceae 1957.
6. Ewing W. H. — J. Immunol. 1954, **72,** 404.
7. Gorea A., Olinici N. et Grümberg R. — I-e Session scientifique de l'Inst. Dr. I. Cantacuzène, Déc. 1955, 101.
8. Gorea A. Olinici N. et Grümberg R. — I-e Session scientifique de l'Inst. Dr. I. Cantacuzène, Déc. 1955, 103.
9. Gorea A. et Măldăresco I. — Arch. Roum. de Pathol. Exp. et de Microbiologie, 1959, **18,** 245.
10. Kauffmann F. — Enterobacteriaceae, Kopenhaga 1954, E. Munksgard.
11. Metzger M. et Rudnicka I. — Arch. Immunol. i Terap. Doswiad, 1957, **5,** 77.
12. Metzger, M. — Med. Dosw. Microbiol. 1955, **7,** 85.
13. Okabe K. — J. Immunol. 1958, **81,** 285.
14. Olinici N., Gorea A. et Grümberg R. — I-e Session Scien. de l'Inst. Cantacuzène Déc. 1955, pag. 105.
15. Rauss K. — Dysenterie, Budapest 1955.
16. Săsărman A., Tulpan G. et Vulcan V. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie, 1958, **17,** 309.
17. Săsărman A. et Vulcan V. — Microbiol., Parazitol. Epidemiol., 1958, No. 6, 495.
18. Seeliger H. — Beitr. Hyg. Epid., 1953, H. 6, Leipzig.
19. Serény B. — Acta Microb. Acad. Sc. Hung., 1955, **2,** 293.
20. Vandepitte. — Arch. Soc. Belg. Med. Trop. 1950, **30,** 1567.
21. Weil A. J., Farsetta K. et Knaub V. — J. Immunol. 1946, **52,** 231.

## БИОХИМИЧЕСКИЕ И СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ 240 ШТАММОВ *Sh. flexneri* ТИПА 2. ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННОЙ СТРУКТУРЫ САМОПРОИЗВОЛЬНО ПОЯВЛЯЮЩИХСЯ ФАЗОВЫХ ВАРИАНТОВ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Изучались 240 штаммов выделенных и опознанных в течении 1954—1955 годов как *Sh. flexneri*

Все 240 штаммов *Sh. flexneri* 2 сбраживали глюкозу и арабинозу, а не сбраживали адонит, салицин, инозит и лактозу.

Большинство стаммов (74,6) сбраживали одновременно манит и рамнозу, разделяясь в 4 биохимических типа на основании поведения по отношению к мальтозе (в общем 41,6% мальтозоположительных штаммов) и к дульциту (в общем 30,8% дульцитоположительных штаммов). 14% штаммов были манитоотрицательными и 13,5% рамнозоотрицательными.

Среди остальных углеводов, сахароза сбраживалась 15-ю штаммами (6,2%), а сорбит и ксилоза, каждый 4-мя штаммами (1,6%). 14,5% штаммов были индол-положительными.

Из 240 штаммов обладающих при выделении антигеном II, 216 (90%) принадлежали к типу 2а, 15 (6,2%) — к типу 2 б и 9 (3,7%) не обладали групповыми антигенами 3,4 или 7,8, 9.

10 штаммов типа 2а (4,6%) перетерпели фазовые изменения, развивающиеся по нашим наблюдениям (путем агглютинации и прямых и перекрестных адсорбций) в 2 этапах: в первом этапе штаммы теряют специфический антиген II (В фаза), а во 2-ой теряют также и групповые антигены 3,4 (С фаза). Штаммы поступившие в первый этап фазовых изменений проявляют новый групповый антиген, присутствующий также у некоторых штаммов 5-ого типа (возможно и у некоторых штаммов других типов), которому мы дали название 10.

Из 10 штаммов перетерпевших такие изменения, 7 (3,2% из общего количества штаммов 2а) были застигнуты в В фазе и 3 (1,4%) в С фазе.

## BIOCHEMISCHE UND SEROLOGISCHE BEOBACHTUNGEN ÜBER 240 STÄMME VON *SH. FLEXNERI* TYPUS 2. DIE ANTIGENSTRUKTUR EINIGER SPONTAN-AUFGETRETENER PHASENVARIANTEN

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden 240 während der Jahre 1954—1955 isolierte Stämme von *Sh. flexneri* Typus 2 untersucht.

Alle 240 Stämme von *Sh. flexneri* 2 vergärten Glukose und Arabinose, jedoch nicht Adonit, Salizin, Inosit und Laktose.

Die meisten Stämme (74,6%) vergärten gleichzeitig auch Mannit und Rhamnose und konnten auf Grund ihres Verhaltens gegenüber Maltose (insgesamt 41,6% Maltose-positive Stämme) und Dulzit (insgesamt 30,8% Dulzit-positive Stämme) in 4 biochemische Typen eingeteilt werden. 14% der Stämme waren Mannit-negativ und 13,5% Rhamnose-negativ.

Von den anderen Zuckerarten, wurden Saccharose von 15 Stämmen (6,25%) und Sorbit und Xylose von je 4 Stämmen (1,6%) vergärt. 14,5% der Stämme waren Indol-positiv.

Von den 240 im Augenblick der Isolierung das Antigen II aufweisenden Stämmen, gehörten 216 (90%) zum Typus 2a, 15 (6,2%) zum Typus 2b und 9 (3,7%) besassen keine Antigene der Gruppen 3, 4 oder 7, 8, 9.

Zehn Stämme des Typus 2a (4,6%) wiesen eine Phasenvariation auf, die sich unseren Untersuchungen zufolge (Agglutinationen und direckte und gekreuzte Absorption) in zwei Etappen abspielt. In der ersten verlieren die Stämme das typenspezifische Antigen II (B-Phase). und in der zweiten auch das Gruppenantigen 3, 4 (C-Phase). Die in der ersten Etappe begriffenen Stämme weisen ein neues Gruppenantigen auf, das auch bei manchen, von uns 10 genannten Stämmen des Typus 5 (wahrscheinlich auch bei einigen Stämmen von anderem Typus) vorhendan ist.

Von die 10 Stämme die die Phasenvariation überstanden haben, 7(3,2% der Stämme 2a) waren in B-Phase und 3 (1,4%) in C. Phase gefunden.

## BIOCHEMICAL AND SEROLOGICAL OBSERVATIONS CONCERNING 240 STRAINS OF *SH. FLEXNERI* TYPE 2. THE ANTIGEN STRUCTURE OF SOME SPONTANEOUSLY ARISEN PHASE VARIENTS

SUMMARY

A number of 240 strains isolated during the period 1954—1955 and diagnosed as *Sh. flexneri* type 2 have been investigated.

All the 240 strains of *Sh. flexneri* 2 fermented glucose and arabinose but did not ferment adonite, salicin, inosite, and lactose.

Most of the strains (74.6 per cent) also fermented mannite and rhamnose and could be divided into 4 biochemical types according to their behaviour towards maltose (41.6 per cent maltose-positive strains) and dulcite (30.8 per cent dulcite-positive strains); 14 per cent of the strains were mannite-negative, and 13.5 per cent rhamnose-negative.

As regards the other sugars, saccharose was fermented by 15 strains (6.2 per cent), and sorbite and xylose by 4 strains each (1.6 per cent), 14.5 per cent of the strains were indole-positive.

Of the 240 strains which contained antigen II at the time of their isolation, 216 (90 per cent) belonged to type 2a, 15 (6.2 per cent) to type 2b, and 9 (3.7 per cent) contained no 3,4 or 7,8,9 group antigens.

Ten strains of type 2a (4.6 per cent) underwent phase variation, which according to our investigations (agglutinations and direct and crossed absorptions) takes place in two steps: during the first, the strains lose their type-specific antigen II (phase B), and during the second they lose the group antigen 3,4 as well (phase C). The strains engaged in the first step of the phase variation display a new group antigen which is also present in some strains of type 5 (in some strains of other types as well) and which we have termed 10.

From the 10 strains which suffered this phase variation, 7 (3.2 per cent from 2a strains) were found in the B-phase and 3 (1,4 per cent) in the C. phase.

# ÉTUDE DE LA STRUCTURE ANTIGÉNIQUE ET LA VARIATION DE PHASE DE CERTAINES SOUCHES DE *SH. FLEXNERI* TYPE 5

par

T. Meitert et A. Gorea

*(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service de la Dysenterie)*

— Manuscrit reçu le 20 juin 1960 —

Des recherches antérieures (1) sur la variation de phase chez *Sh. flexneri* type 2a ont révélé des relations antigéniques entre les variantes de phase de ce type et celles d'une souche de *Sh. flexneri* type 5 (G541). On a constaté que ces relations étaient dues à une fraction antigénique commune, dénommée par nous antigène de groupe 10, indépendante de la fraction 1 ou autres fractions connues chez les souches de *Sh. flexneri.*

Dans cette note, nous exposons les observations concernant la variation de phase chez la *Sh. flexneri* type 5, en même temps que les recherches sur l'incidence de la fraction antigénique de groupe 10 sus-mentionnée, chez les souches de ce type.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

On a étudié 22 souches de type 5, isolées pour la plupart (19 souches) en Roumanie entre 1954—1956. On a également utilisé des souches de *Sh. flexneri* d'autres types (souches des collections *Weil* et *Sartorius).*

Les sérums agglutinants ont été préparés sur lapins de 2 à 3 kg, par 3—4 inoculations intraveineuses, en doses croissantes de germes vivants, à intervalles de 5—6 jours.

Les sérums absorbés ont été préparés d'après la méthode classique, à l'aide de germes inactivés par chauffage (1 heure à 60°C). Une partie des sérums d'espèce, de type ou de groupe, nous ont été livrés par l'Institut « Dr. I. Cantacuzino ».

## RÉSULTATS

Il a été montré antérieurement (1) que les variantes de phase B et C de *Sh. flexneri* 2a sont agglutinées par le sérum absorbé de type V, préparé avec la souche G541, mais ne sont pas agglutinées par le sérum de type V, préparé avec la souche G. *Sartorius.*

Afin d'étudier leur structure antigénique, nous avons d'abord étudié l'agglutinabilité des 22 souches de *Sh. flexneri* type 5 disponibles vis-à-vis des sérums suivants (Tableau I):

**Comportement sérologiqu**

| Souches / Sérums | 541 G | G. Sart. | 5 Budapest | 5(×—) Budapest | 7 G | 8 G | 12 G | 15 G | 16 G | 18 G |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Sérum Flexner polyvalent | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | +++ |
| Sérum V | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | 0 |
| Sérum groupe 7, 8, 9 | 0 | ++++ | ++++ | 0 | 0 | ++++ | ++++ | 0 | ++++ | 0 |
| Sérum groupe 10 | ++++ | 0 | 0 | ++++ | ++++ | 0 | 0 | ++++ | 0 | +++ |
| Variante antigénique | II | I | I | II | II | I | I | II | I | III |

1. Sérum Flexner polyvalent.

2. Sérum absorbé de type V, préparé par l'absorption du sérum G. *Sartoriu* avec les souches BC (I: 1,2,4,5,9) et X (—: 1, (3,4), 7,8,9).

3. Sérum absorbé de type V, préparé par absorption du sérum G541 ave une souche 1a (I: 1,2,4,5,9) et une souche 2a, en phase c (—: 1′, 10). Vu qu nos souches se comportent pareillement envers ce sérum qu'envers le sérur No. 2, nos études se limiteront à ce dernier.

4. Sérum absorbé groupe 7,8,9, préparé par absorption du sérum 2b ave la souche 2a.

5. Sérum absorbé groupe 10, préparé par absorption du sérum G541 ave la souche G. *Sartorius.*

Le tableau I montre une série de souches qui, au moment de l'étude (aprè avoir été gardées environ 1 an dans le laboratoire), n'agglutinent plus avec l sérum de type V, bien qu'elles eussent agglutiné au moment de l'isolement On constate de même, que les souches dépourvues des antigènes 7,8,9 son agglutinées par le sérum du groupe 10 et inversement.

Sur la base de l'agglutinabilité, ainsi qu'elle a été exposée dans le Tableau I on constate l'existence de 3 variantes antigéniques (Tableau II).

Afin d'étudier la structure antigénique de ces variantes, on a préparé de sérums avec deux souches de chaque variante, comme suit:

Pour la variante I avec les souches G. *Sartorius* et G19

Pour la variante II avec les souches G541 et G48

Pour la variante III avec les souches G37 et G18

Effectuant des réactions directes et croisées d'agglutination et absorption on a constaté que les sérums préparés avec des souches appartenant à la mêm variante antigénique se comportent identiquement (Tableau III).

*Tableau I*

**des souches de type 5**

| 19 G | 21 G | 22 G | 25 G | 26 G | 28 G | 36 G | 37 G | 42 G | 43 G | 48 G | 49 G |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | 0 | 0 | ++++ | 0 | ++++ | 0 | ++++ | 0 |
| ++++ | 0 | ++++ | ++++ | 0 | 0 | ++++ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | ++++ | 0 | 0 | ++++ | ++++ | 0 | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| I | II | I | I | III | III | I | III | II | III | II | III |

*Tableau II*

**Comportement des souches Sh. flexneri type 5 vis-à-vis des sérums V, 7, 8, 9 et 10 (agglutination sur lame)**

| Sérums / Variantes antigéniques | V | 7, 8, 9 | 10 | Nombre des souches |
|---|---|---|---|---|
| I | ++++ | ++++ | 0 | 9=41% |
| II | ++++ | 0 | ++++ | 7=31,8% |
| III | 0 | 0 | ++++ | 6=27,2% |

Il résulte du tableau III que la souche G. *Sartorius* réussit à éloigner les anticorps du sérum G541 seulement pour la souche homologue (G. *Sartorius*) et non pour les souches G541 et G37. Ce fait nous permet de supposer que la souche G541 possède une fraction antigénique de groupe, en plus de celles présentées par la souche G. *Sartorius*. L'hypothèse selon laquelle cette fraction serait identique à l'antigène groupe 5 a été éliminée par le fait que les sérums absorbés, contenant exclusivement des anticorps correspondant à l'antigène 10, agglutinent une série de souches de *Sh. flexneri* de divers types, chez lesquels la fraction de groupe 5 n'a jamais été signalée et n'agglutinent point les souches qui possèdent cette dernière fraction (ex. souche 1b).

*Tableau III*

**Résultats des réactions d'agglutination avec les sérums non-absorbés et absorbés préparés avec les souches G. Sartorius, 541 G et 37 G.**

| Sérums / Souches | G Sart. non-absorb. | G. Sartorius absorbé avec: | | | 541 G non-absorb. | 541 G absorbé avec: | | | 37 G non-absorb. | 37 G absorbé avec: | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | G Sart. | 541 G | 37 G | | G. Sa t. | 541 G | 37 G | | G Sart. | 541 G | 37 G |
| G. Sartorius | 12800 | 0 | 800 | 6400 | 3200 | 0 | 0 | 3200 | 1600 | 0 | 0 | 0 |
| 541 G | 12800 | 0 | 0 | 3200 | 12800 | 3200 | 0 | 6400 | 3200 | 1600 | 0 | 0 |
| 37 G | 12800 | 0 | 0 | 0 | 12800 | 3200 | 0 | 0 | 6400 | 3200 | 0 | 0 |

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

La variation de phase chez la *Sh. flexneri* type 5 a été décrite par Boyd (2), qui a montré que la phase B de ce type se rapproche des souches 103 B et Y *Hiss Russel*, possédant en plus un élément particulier propre.

La variation de phase chez *Sh. flexneri* type 5 a été ensuite observée par Nakamura (3,4) et d'autres auteurs (2—8).

Weil et coll. (5,6) indiquent chez certaines souches de *Sh. flexneri* type 5 la prédominance de l'antigène VII (X), constituant le soi-disant type V—VII et que les sérums produits avec ces souches peuvent être entièrement absorbés avec certaines souches VII. Selon Rauss, (7), ces variantes présentent une grande analogie avec la *Sh. flexneri* 2a, lors de la production des variantes B. Confirmant la présence de ces variantes, Rauss (7) propose la suivante variation de phase pour la *Sh. flexneri* type 5: V—VII . . . (V) . . . VII.

Récemment, Metzger et Rudnicka (8) signalent des relations antigéniques entre *Sh. flexneri* 2a, la variante C, et la *Sh. flexneri* type 5.

Nos études ont permis la mise en évidence de trois variantes antigéniques: I, II et III, respectivement 41%, 31,8% et 27,2% des souches étudiées.

Contrairement à la variante III, les autres deux variantes antigéniques I et II se caractérisent par la présence de l'antigène de type V. La variante I possède les antigènes de groupe 7,9 alors que la variante II possède le nouvel antigène de groupe, dénommé par nous antigène 10. Attendu que dans ce cas il ne s'agit pas de la perte de l'antigène de type (comme dans le cas des variations de phase décrites chez le groupe *Sh. flexneri)*, on peut supposer que ces deux variantes antigéniques I et II constituent deux sous-types (5a et 5b) dans le cadre du type 5. La variante III peut être considérée comme une variante de phase provenue du sous-type 5b.

Tenant compte de la formule connue des souches des *Sh. flexneri* type 5 (V: 1,5, (7,9)), ainsi que des données obtenues par les réactions d'agglutination directe et croisée avec les sérums absorbés et non-absorbés (illustrées dans le tableau III), on peut établir la suivante structure antigénique des souches étudiées. (Tableau IV)

La présence de l'antigène de groupe 10 chez les souches de *Sh. flexneri* de divers types, soulève des problèmes importants quant au diagnostic sérologique et à la sélection des souches nécessaires à la préparation de certains sérums absorbés de type.

*Tableau IV*

**Structure antigénique des variantes de *Shigella flexneri* type 5**

| Souche représentative | Antigènes spécifiques | Antigènes de groupe | Variante antigénique |
|---|---|---|---|
| G. Sartorius | V | 1, 5, 7, 9 — | I = sous-type 5a |
| G541 | V | 1, 5 — — 10 | II = sous-type 5b |
| G37 | — | 1, 5 — — 10 | III = variante de phase du sous-type 5b |

Il va de soi qu'en utilisant une variante II (sous-type 5b) pour la production du sérum absorbé de type V, ce dernier agglutinera aussi les phases B et C de *Sh. flexneri* 2a. Afin d'éviter de tels impédiments, il est recommandable de préparer le sérum de *Sh. flexneri* type V absorbé, seulement avec une souche appartenant à la variante antigénique I (sous-type 5a, ex.: souche *G. Sartorius*).

Il est à remarquer que toutes les soi-disant souches « 5 (x moins) » étudiées (la souche 5 (x—) Budapest inclusivement), possédant l'antigène de groupe 10, étaient des variantes antigéniques II de type *Sh. flexneri* 5; par conséquent, elles ne sont pas indiquées pour la préparation des sérums de type V, contrairement aux recommandations de certains auteurs.

La présence des souches de *Sh. flexneri* modifiées du point de vue antigénique, dans le sens de la perte de l'antigène de type et de certains antigènes de groupe, revèle un nouvel aspect du contrôle bactériologique des souches isolées des malades et porteurs et impose l'introduction d'un sérum de groupe 10 dans le travail de routine. Ceci pourrait contribuer à élucider certains faits épidémiologiques dans les cas où il n'a pas été possible de mettre en évidence des bacilles dysentériques typiques, améliorant sensiblement les résultats du diagnostic bactériologique de la dysenterie bacillaire.

BIBLIOGRAPHIE

1. Gorea A. et Meitert T. — Arch. Roum. de Pathol. Exp. et de Microbiologie 1961, **20**, 301.
2. Boyd J. S. K. — J. Hygiene, 1938, **38**, 477.
3. Nakamura N. — Jap. J. Bact., 1953, **8**, 933 (cité par Okaba K.) — J. Imm., 1958, **81**, 285).
4. Nakamura N. — Jap. J. Bact., 1954, **9**, 9 et 227 (cité par Okaba).
5. Weil A. J. et Black J. et Farsette K. — J. Immunol. 1944, **49**, 321.
6. Weil A. J. et Black J. et Farsette K. — J. Immunol., 1944, **49**, 341.
7. Rauss K. — Dysenteria, Budapest, 1955, Müverlt Nép.
8. Metzger M. et Rudnicka I. — Arch. Immunol. Terapii Doswiad., 1957, **5**, 77.

## ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННОЙ СТРУКТУРЫ И ФАЗОВОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ НЕКОТОРЫХ ШТАММОВ *Sh. flexneri* ТИПА 5

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Представлены наблюдения касающиеся фазовой изменчивости у *Sh. flexneri* типа 5 и в то же время исследования касающиеся частоты групповой антигенной фракции 10, описанной авторами в другой работе и повидимому общей у нескольких типов *Sh. flexneri*.

Путем реакций агглютинации и прямых или перекрестных абсорбций выявлены 3 антигенных варианта (I, II и III) представляя соответственно 41%, 31,8% и 27,2% исследуемых штаммов.

Антигенные варианты I и II характеризуются наличием антигена типа 5, в то время как групповые антигены 7,9 присутствуют только у варианта I. Что касается антигенного варианта III, то идет речь о штаммах, которые потеряли типовый антигенV причем в то же время у этих штаммов наблюдается присутствие новой групповой антигенной фракции (общая как для антигенного варианта II так и для B и C фаз *Sh. flexneri* 2a) — групповый антиген 10.

О настоящей фазовой изменчивости можно говорить только применительно к штаммам, принадлежащим к антигенному варианту III; остальные два антигенных варианта (I и II) нужно считать скорее подтипами (5a и 5b) типа 5.

На основании полученных результатов авторы рекомендуют приготовлять абсорбированную сыворотку для типа 5 со штаммом *Sh. flexneri* типа 5, принадлежащим к антигенному варианту I, лишенным антигенои фракции 10, для того чтобы избегать диагностические ошибки, которые могут встречаться при приготовлении этой же сыворотки при помощи штаммов *Sh. flexneri* типа 5, принадлежащих к антигенным вариантам типа II и III.

Для улучшения бактериологической диагностики группы *Sh. flexneri* авторы рекомендуют ввести для практической работы групповую абсорбированную сыворотку 10.

## UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ANTIGENSTRUKTUR UND DIE PHASEN-VARIATION BEI EINIGEN STÄMMEN VON *SH. FLEXNERI* TYPUS 5.

ZUSAMMENFASSUNG

Beobachtungen über die Phasenvariation bei *Sh. flexneri* Typus 5 sowie Untersuchungen über das Vorkommen der Gruppenantigenfraktion 10 werden wiedergegeben. Die betreffende Antigenfraktion wurde von den Verfassern in einer anderen Arbeit beschrieben und scheint mehreren Typen von *Sh. flexneri* gemeinsam zu sein.

Durch Agglutinationen und direkte und gekreuzte Absorptionen wurden 3 Antigenvarianten nachgewiesen (I, II und III), die je 41%, 31,8% und 27, 2% der untersuchten Stämme ausmachten.

Die Antigenvarianten I und II sind durch die Anwesenheit des Typenantigens V gekennzeichnet, während die Gruppenantigene 7, 9 nur bei der Variante I vorhanden sind. Im Falle der Antigenvariante III handelt es sich um Stämme, die das Typenantigen V durch Aufbewahrung im Laboratorium verloren haben. Gleichzeitig wird bei diesen Stämmen das Auftreten einer neuen Gruppenantigenfraktion, des Gruppenantigens 10 beobachtet. Dasselbe Antigen liegt sowohl bei der Antigenvariante II als auch bei den Phasen B und C von *Sh. flexneri* 2a vor.

Von einer Phasenvariation im eigentlichen Sinne kann nur bei den Stämmen der Antigenvariante III gesprochen werden. Die beiden anderen Antigenvarianten (I und II) müssen eher als Untertypen (5a und 5b) im Rahmen des Typus 5 aufgefasst werden.

Auf Grund der erhaltenen Ergebnisse, empfehlen die Verfasser, bei der Herstellung des absorbierten Typenserums 5 einen *Sh. flexneri* -5-Stamm der Antigenvariante I zu verwenden (dem die Antigenfraktion 10 fehlt). Dadurch werden diagnostische Irrtümer, die im Falle der Herstellung dieses Serums mit *Sh. flexneri*-5-Stämmen der Antigenvariation II und III auftreten könnten, vermieden.

Zur Verbesserung der bakteriologischen Diagnose bei der *Sh. flexneri*-Gruppe, empfehlen die Verfasser die Einführung eines absorbierten Gruppen-serums 10 in die laufende Laboratoriumsarbeit.

## A STUDY OF THE ANTIGENIC STRUCTURE AND OF PHASE VARIATION IN SOME STRAINS OF *SH. FLEXNERI* TYPE 5.

SUMMARY

Observations are reported concerning phase variation in *Sh. flexneri* type 5 and at the same time investigations concerning the incidence rate of the group antigen fraction 10. The latter has been described by the authors in a previous paper and appears to be common to several types of *Sh. flexneri.*

Three antigenic variants (I, II, and III) could be demonstrated by means of agglutination reactions and direct and crossed absorptions. The incidence rates of these variants among the strains investigated are 41 per cent, 31.8 per cent, and 27.2 per cent respectively.

The antigenic variants I and II are characterized by the presence of type antigen V, while the group antigens 7,9 are present in variant I only. In the case of antigenic variant III, the strains have lost their type antigen V following maintenance in the laboratory. At the same time, these strains display a new group antigen fraction (which they share with antigenic variant II as well as with phases B and C of *Sh. flexneri* 2a), i.e. group antigen 10.

Phase variation in the proper sense of the word can only be considered to have occurred in the strains belonging to the antigenic variant III, the other two antigenic variants (I and II) being rather subtypes within type 5 (5a and 5b).

On the ground of these results, the authors suggest that absorbed type 5 serum should be prepared by means of the *Sh. flexneri* type 5 strain belonging to antigenic variant I lacking antigenic fraction 10, in order to avoid diagnostic errors which may result from the preparation of this serum by means of *Sh. flexneri* type 5 strains belonging to the antigenic variants II and III.

In order to improve bacteriological diagnosis in the *Sh. flexneri* group it would be advisable to adopt the use of an absorbed group 10 serum in routine work.